

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-512650

(P2000-512650A)

(43) 公表日 平成12年9月26日 (2000.9.26)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 K 31/715		A 6 1 K 31/725	
31/00	6 1 9	31/00	6 1 9 A

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 57 頁)

(21) 出願番号 特願平10-502311
 (86) (22) 出願日 平成9年6月20日 (1997. 6. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年12月21日 (1998. 12. 21)
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 7 / 0 3 2 3 8
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 4 9 4 1 2
 (87) 国際公開日 平成9年12月31日 (1997. 12. 31)
 (31) 優先権主張番号 P D 9 6 A 0 0 0 1 6 3
 (32) 優先日 平成8年6月21日 (1996. 6. 21)
 (33) 優先権主張国 イタリア (I T)

(71) 出願人 フィディアー・ソシエタ・ベル・アチオニ
 イタリア、イー-35031アバーノ・テルメ、
 ヴィア・ボンテ・デッラ・ファブリーカ 3
 /ア番
 (72) 発明者 ベリーニ, ダヴィデ
 イタリア、イー-35036モンテグロット・テ
 ルメ、ヴィア・ボ34番
 (72) 発明者 パバレラ, アンナマリア
 イタリア、イー-70100バリ、ヴィア・プリ
 ンチベ・アメデオ320番
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己架橋ヒアルロン酸及び関節障害の処置のための関連する医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は自己架橋形のヒアルロン酸を、単独で、または第2成分の非架橋ヒアルロン酸を含む混合物中で第一成分として、および場合により他の薬理学的に活性な物質との組合せで、含む組成物に関する。これらの組成物はユニークな粘弾性的性質のため関節障害の処置に用いることができる。

【特許請求の範囲】

1. (1) 自己架橋ヒアルロン酸、または自己架橋ヒアルロン酸と非架橋ヒアルロン酸の混合物、および (2) 医薬的に受容し得る賦形剤、希釈剤または担体、を含む、関節障害を処置するための医薬組成物。
2. 成分 (1) が自己架橋ヒアルロン酸である請求項 1 に記載の医薬組成物。
3. 成分 (1) が自己架橋ヒアルロン酸と非架橋ヒアルロン酸の混合物である請求項 1 に記載の医薬組成物。
4. 少なくとも 1 の薬理学的に活性な物質を更に含む請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の医薬組成物。
5. ヒアルロン酸が 500,000 ～ 1,230,000 D の分子量を有する請求項 4 に記載の医薬組成物。
6. 分子量が 500,000 ～ 730,000 D である請求項 5 に記載の医薬組成物。
7. 薬理学的に活性な物質が抗生物質である請求項 4 に記載の医薬組成物。
8. 薬理学的に活性な物質がステロイド抗炎症剤である請求項 4 に記載の医薬組成物。
9. 薬理学的に活性な物質が、非ステロイド性抗炎症剤である請求項 4 に記載の医薬組成物。
10. 薬理学的に活性な物質が麻酔剤、上皮親和性ビタミン、ホルモントタイプの抗炎症／鎮痛剤、サイトカイン、サイトカイン受容体、または増殖因子である請求項 4 に記載の医薬組成物。
11. 薬理学的に活性な物質が塩化したヒアルロン酸である請求項 4 に記載の医薬組成物。
12. ヒアルロン酸が銀、銅、亜鉛、カルシウム塩で塩化されている請求項 11 に記載の医薬組成物。
13. 自己架橋ヒアルロン酸と非自己架橋ヒアルロン酸の割合が約 95 : 05 ～ 約 05 : 95 である請求項 3 に記載の医薬組成物。
14. 自己架橋ヒアルロン酸と非自己架橋ヒアルロン酸の割合が約 75 : 25 ～ 約

25 : 75である請求項3に記載の医薬組成物。

15. 請求項1に記載の医薬組成物の有効量を関節障害によって影響を受けている患者に関節内に投与することを含む処置方法。

16. 関節障害の処置における自己架橋ヒアルロン酸を含む医薬組成物の使用。

17. 組成物が非架橋ヒアルロン酸を更に含む請求項16に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

自己架橋ヒアルロン酸及び関節障害の処置のための関連する医薬組成物

発明の概要

本発明は、自己架橋形のヒアルロン酸を、単独で、または第2成分との混合物中の第1成分として、及び場合により他の薬理学的に活性な物質と組合せて、含む組成物に関する。これらの組成物はそのユニークな粘弾性的な性質のため、関節障害の処置に用いることができる。

発明の背景

ヒアルロン酸 (HA) は、関節の軟骨および滑液(synovial fluid)中に特に高濃度で存在する、グリコサミノグリカン ファミリーの天然に存在する多糖である。滑液は、低剪断応力 (ゆっくり動く関節に対応する) では、粘性の液体として作用するが、高剪断応力 (早く動く関節に対応する) では弾性的な挙動を示すことが示されている (Balazs E.A., Univ. of Michigan, Med. Ctr. J. (Special Arthritis Tissue), 1968年12月, 255)。変形性関節症およびリウマチ様関節炎等の関節障害を有する患者においては、滑液の粘弾性的な性質が損なわれており、これはHA成分により与えられる粘弾性的寄与の減少を反映することが証明されている (小林等、Biorheology, 1994, 31, 325-244)。これは、健常なボランティアと変形性関節症のドナーの関節からの滑液のレオロジー的プロフィールを示す図1から明白である (“The Rheological and Biological Function of Hyaluronic Acid”、E. A. Balazs, D. A. Gibbs, Chemistry and Molecular Biology of Intercellular Matrix中、E. A. Balazs編, Academic Press, 1970)。変形性関節症の場合と異なり、正常な滑液中では、粘弾性値は大きく、 G' および G'' は互いに交差する。このクロスオーバーポイントの存在は、HAの濃度 (2 ~ 4 mg/ml) に関連するのみならず、特にその高分子量 (約4 ~ 5百万) にも関連する。一方変形性関節症患者では、ヒアルロン酸の分解 (その結果の分子量の低下) およびその濃度の低下 (1 ~ 2 mg/ml) の両方がある。

関節内注入による高度に精製された外来のHAの投与は、変形性関節炎の処置に有効であることが示されている。これは、HAのユニークな粘弾性的な性質に

よるだけでなく、その可能性ある薬理学的性質にもよる。事実、関節内注入による変形性関節症の処置のため現在市販されている商業的なHAをベースにした製品は、これらの病理学的処置におけるHA作用様式に関する思想の2つの学派を反映する。非改変のHAが、滑液の粘弾性的性質の一時的な再確立を引き起こすことの外に、薬理学的な活性を示すという強力な証拠がある (G. AbtangeloおよびM. O'Regan, Eur. J. Rheumatol. Inflamm., 1955, 15, 1:9-16; P. Ghosh, Clin. Exp. Rheumatol. 1993, 12, 1-8; R. S. Strachan等, An. Rheum. Dis., 1990, 49:949-952)。一方、化学的に架橋したHA誘導体の製品は、これらの誘導体が専ら機械的手段により作用するという仮説を促進する (E. A. BalazsおよびJ. L. Denlinger, J. Rheumatology, 1993, vol. 20, supplement 39:3-9)。

変形性関節炎の外の関節障害の他の形は、関節変形または骨折修復および関節鏡検査後の固定のような、関節に行われる特別な機械的なまたは外科手術の結合として生じうる関節の滑液の粘弾性性質の改変から生じ得る。これらの介入の機能的な結果の処置において、HAまたはその誘導体の潤滑可能性は、該化合物の長期の薬理学的効果より適切であり得る。更に、HAは関節において早いターンオーバーを有することか知られている (Brown T. J. 等, Exp. Physiol., 1991, 76, 125-134; Fraser J.R.E.等, Semin. Arthritis Rheum., 1993, 22(Suppl.1), 9-17; Laurent U.B.G等, Matrix, 1992, 12, 130-6)。従って、本発明の製剤の更なる目的は、関節障害の処置のために関節に注入される外来のHAの滞留時間を増加させることである。

発明の目的

従って、場合により適当な医薬賦形剤または担体および/または関節内使用の薬剤を伴う、新しい、ヒアルロン酸 (HA) および/または自己架橋多糖 (ACP) をベースにした組成物を提供するのが本発明の目的であり、該組成物は関節障害の処置のための適当な粘弾性的な性質を有する。

天然のHAの容器(reservoirs)として作用する組成物を提供するのが本発明の他の目的である。

本発明の他の目的は、適当な粘弾性的な性質と関節内での滞留時間を示し、そ

の必要のある患者に有効量で投与する、HAおよび／またはACPをベースにした組成物を運搬することによる、関節障害の処置方法を提供することである。

上述の、および他の目的は、本発明に従い、以下の組合せの1を提供することにより達成される：

1. 自己架橋形のヒアルロン酸単独；または
2. 第2成分としてヒアルロン酸および／または関節内使用のための薬剤を含む混合物の第1成分として自己架橋形のヒアルロン酸。

図面の簡単な説明

本発明を添付図面で更に説明する。

図1は、若い健常ドナー、老年の健常ドナーおよび変形性関節症ドナーからのヒトの滑液の粘弾性スペクトルを示す。

図2A-2Dは、リン酸塩緩衝液中での、異なった割合のACP/HA混合物の粘弾性スペクトルを示す。Cp = 1重量/重量%、T = 25°C (G' (°); G'' (°) η^* , (∇);

図3は、ACP成分 (%) の関数として貯蔵弾性率 (G' (°) および損失弾性率 (G'') (°) を示す。周波数 = 0.72 rad/秒 (通常の歩くペースでの関節の動きに対応する)

図4は、様々な比のACP/HAの製剤の動的粘度の比較を示す。

図5は、ACP/HA, 100/0; ACP 20%, 0.5% H₂Oの製剤の粘弾性スペクトルを示す。

図6は、ACP/HA, 75/25; ACP 20%, 0.5% H₂Oの製剤の粘弾性スペクトルを示す。

図7は、ACP/HA, 50/50; ACP 5%, 0.5% H₂Oの製剤の粘弾性スペクトルを示す。

図8は、ACP/HA, 50/50; ACP 20%, 0.5% H₂Oの製剤の粘弾性スペクトルを示す。

図9は、ACP/HA, 100/0; ACP 20%, 10% および 5%, 0.5% H₂Oの製剤の動的粘度の比較を示す。

図10は、ACP/HA, 50/50; ACP 20%, 10%, および 5%,

0.5% H₂Oの製剤の動的粘度の比較を示す。

図11は、ACP/HA, 40/60; ACP 20%および5%, 0.5% H₂Oの製剤の動的粘度の比較を示す。

図12は、変形性関節症でないウマからの滑液の粘弾性スペクトルを示す。

図13は、ACP/HA, 100/0; ACP 10%, 0.5% H₂Oの粘弾性スペクトルを示す。

図14は、ACP 100/0, 10%, 0.5% H₂O, 3.3mg/mlを添加した、変形性関節症でないウマからの滑液の粘弾性スペクトルを示す。

図15は、ACP 100/0, 10%, 0.5% H₂O, 5.5mg/mlを添加した、変形性関節症でないウマからの滑液の粘弾性スペクトルを示す。

図16は、ACP, シンビスク(Synvisc), ファーメンテック(Fermentech), アルツ(Art)およびヒアルガン(Hyalgan)の比較を示す。

発明の詳細な記述

関節障害の処置のため関節に注入される、外来のHAの粘弾性と滑液滞留時間を改良することのできる新しい製剤を提供するのが本発明の目的である。

この製剤は、自己架橋HAを、単独で、または第2成分としてヒアルロン酸を含む混合物中に第1成分として含む。これらの製剤において、自己架橋多糖(ACP)は、EP 0341745 B1に記載されたポリマー鎖間の外来の架橋を導入することなしに、鎖内または鎖間エステル結合の形成に導く、自己架橋工程により得られる。

ACP成分は、50KDの～5,000KDaの範囲の分子量を有するHAから合成でき、医薬グレードの純度およびポリマーのカルボキシル基に関して1～30%の範囲の架橋レベルを有しなければならない。

ACP成分の好ましい例は、ACP 5、ACP 10、ACP 15およびACP 20(数5、10、15および20は、化学反応の化学量論に基づく、架橋の公称(nominal)レベルである)を含む。

従って、これらの自己架橋HA誘導体は、天然のHAに比べて改良された粘弾性を有するため、関節障害の処置のための懸濁液の調製において有利に用いることができる。これらの自己架橋誘導体の分解により天然のHAが放出される。従

ってACP HA誘導体は、分解によりゆっくり放出されて、天然のHAの関節組織との接触時間の延長をもたらす天然のHAの容器であることの外に、理想的な粘弾性材料となる。これらの自己架橋HA誘導体の安全性は、ACPの分解により放出される天然のHAが生理学的代謝経路により代謝されるので、別の架橋反応により製造されたHA誘導体より良好である可能性がある。

更に、水性媒体中でACPのゲル様挙動を考慮すると(Mensitieri等、Abstract, "12th European Conference on Biomaterials" Porto Portugal, Sept. 10-13, 1995), HAをそのACP誘導体とブレンドして、粘弾性と容器性を組合せる広範囲のシステムを得ることが可能である。

ACP単独の理想的でないレオロジー的性質は、患者の条件および処置すべき関節に従って2つの成分の割合を変えて、ACPと非改変HAの混合物から作った医薬組成物を製造することにより、埋め合される。

本発明の製剤に用いるACPとHAの割合は、約95:05～約05/95の割合のACP/HAを一般に含む。ACP/HA製剤の好ましい割合は、75:25～25/75の割合のACP/HAを含む。

本発明のACP/HA製剤は、医薬組成物へとすることができ、麻酔薬、抗生物質、ステロイド性および非ステロイド性の抗炎症剤、ソマトスタチン等のホルモンタイプの抗炎症剤、上皮親和性のビタミン、IL-1およびIL-6等のサイトカイン、サイトカイン受容体、FGF等の増殖因子等の適当な医薬的に活性な薬剤、および許容し得る賦形剤と組合せ得る。更に、HAが銀、銅、亜鉛およびカルシウム塩と塩化された、ACPおよびHAの混合物から出発する医薬組成物を用いることも可能である。これらの医薬組成物は、関節内使用のため半固体または液体の製品に製剤化し得る。

ACPまたはHAのいずれかの形のHAの全量は、3～50mgの範囲である。適当な用量は、適当な医薬賦形剤の2mlの最終体積中に、ACPまたはHAのいずれかの形で20mgの、医薬組成物中に含まれるHAの全量を含むものである。

1. 自己架橋多糖 (ACP) 生成物

本組成物に用いるACP誘導体は、ヒアルロン酸の自己架橋誘導体である。こ

これらの誘導体において、ヒアルロン酸のカルボキシル基のすべてまたは一部が、同じ分子および／または異なるヒアルロン酸（HA）分子のヒドロキシル基でエステル化され、ラクトンまたは分子間エステル結合を形成する。他のアルコールのOH基による介在のない、HAのこれらの「内部」エステルは、「自己架橋多糖」とも定義し得る。何故なら、1または多分子架橋の形成は、上述の内部エステル化の結果であるからである。「架橋」とは、多糖分子のカルボキシルおよびヒドロキシル間の交差線(crosswise)結合をいう。

その内部エステルは、カルボキシル基のすべてまたは一部のみが同じ方法でエステル化しているかによって、全体的または部分的である。部分内部エステルにおいては、更なるカルボキシ基は、一価または多価のアルコール類で全体的に、または部分的にエステル化して、「外部」エステルを形成でき、これら両方のエステル基の部分エステルでは、エステル化されないカルボキシ基は、遊離であってもよく、または金属若しくは有機塩基で塩化されてもよい。

本発明に用いる内部エステルはEP0 341 745 B1に記載の方法により製造することができ、その方法は、活性化を誘導できる物質の添加によるカルボキシ基の活性化を含む。活性化反応から得られる不安定な中間体生成物は、触媒の添加後、および／または温度上昇後に自発的に分離し、同じまたは他のHA分子のヒドロキシルと上述の内部エステル結合を形成する。所望の内部エステル化の程度により、カルボキシ官能基のすべてか、または一部を活性化する（その一部は、過剰の活性化物質を用いるか、または適当なドージング(dosing)方法により得る）。

内部エステル基へ変換すべきカルボキシ基は、遊離カルボキシ基を有する多糖から、或いは好ましくは塩化したカルボキシ基、例えば金属塩、好ましくはアルカリまたはアルカリ土類金属、特に以下に記載するような第4級アンモニウム塩を含む多糖から出発して活性化し得る。しかしアミンのような有機塩基との塩も出発物質として使用できる。

内部エステルへ変換されるカルボキシ基の数は、活性化されたカルボキシ基の数に比例し、この数は用いた活性化剤の量に依存する。全内部エステルを得るためには、従って過剰の活性化剤を用いるべきであり、一方部分エステルの場合に

は、この試薬の量は所望のエステル化度に応じて調節すべきである。

架橋反応後になお遊離であるか、または塩化されているカルボキシ基は、適切な酸を得るために変換し得るし、または1価若しくは多価アルコールでエステル化して、混合エステル、すなわち部分的に自己架橋し、部分的に外的にエステル化したものを得ることができる。勿論アルコールによる部分エステル化は、カルボキシ基の一部の活性化およびその後の内部エステルへの変換前に行うことができる。

製造された架橋生成物において、遊離のカルボキシ基または塩の形のカルボキシ基は、1価または多価のアルコールにより部分的または全体的にエステル化して、部分的に内部そして部分的に外部である結合が混合したエステルを得ることかできる。このエステル化のために用いるアルコールは、以下に記載し、それから混合エステルが誘導されるアルコールに対応する。

EP 0 216 453 A1によれば、第4級アンモニウム塩で出発して、エーテル化剤を用いて、特に、最大で6個の炭素原子を有する低級アルキルのジアルキルスルホキシド、特にジメチルスルホキシド、およびジメチル若しくはジメチルホルムアミド、またはジメチル若しくはジエチルアセトアミドのような低級脂肪酸の低級アルキルのジアルキルアミドのようなジアルキルスルホキシド、ジアルキルカルボキシルアミド等のアプロティック溶媒中で有利に製造できる。反応は好ましくは約25°～75°の温度範囲内で、例えば約30℃で行うべきである。エステル化は、上述の溶媒、例えばジメチルスルホキシドに溶解した上述のアンモニウム塩に、徐々にエーテル化剤を加えることにより好ましくは行う。

内部エステルにおいては、未だ無傷で残っているカルボキシ基を、有機または無機塩基で塩化し得る。そのような塩の形成のための塩基の選択は、生成物の意図する用途に基づく。無機塩は好ましくは、ナトリウム若しくはカリウム塩等のアルカリ金属塩、アンモニウム塩、セシウム塩、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属の塩、またはアルミニウム塩である。

有機塩基の塩は、特に、脂肪族、アルアリファティック、脂環式または複素環式アミンの塩である。このタイプのアンモニウム塩は、治療的に受容できるが不活性なアミンから、または治療作用を有するアミンから誘導する。前者のうち、

最大で18の炭素原子を有するアルキル基を有するモノ、ジおよびトリアルキルアミン等の脂肪族アミン、または脂肪族部分に同数の炭素原子を有し、アリールが1～3のヒドロキシ基で置換していることもあるベンゼン環を意味するアリールアルキルアミンに特別の考慮を払うべきである。治療的に受容し得るがそれ自体活性でないアミンとして、4～6個の炭素の環を有し、酸素、硫黄、窒素等のヘテロ原子によってさえぎられていることがあるアルキレンアミン、例えばピペリジン、モルホリンまたはピペラジン等の環状アミンが非常に適しており、アミノエタノール、エチレンジアミンまたはコリンの場合のように、例えばアミノまたはヒドロキシ基により置換されていてもよい。

1価また多価アルコールでエステル化されたカルボキシ基も有するACP誘導体においては、これらの官能基が上述の方法の出発物質中に存在しようと、またはその方法の終りで導入されようと、アルコールは脂肪族、アルアリファティック、脂環式または複数環式シリーズに属し得る。

エステル化剤として用いる脂肪族シリーズのアルコールは例えば最大34の炭素原子を有するアルコールであり、それは飽和または不飽和であり得、アミノ、ヒドロキシル、アルデヒド、ケト、メルカプト、カルボキシ基等の他の遊離の官能基または機能的に修飾された基により、或いはこれらから誘導される基、例えばヒドロカルビルまたはジヒドロカルビルアミノ基（本明細書において「ヒドロカルビル」という語は、例えば C_nH_{2n+1} タイプの1価ラジカルのみならず、「アルキレン」 C_nH_{2n} または「アルキリデン」 C_nH_{2n} 等の2価または3価ラジカルをも意味する）、エーテルまたはエステル基、アセタールまたはケタール基、チオエーテルまたはチオエステル基、エステル化されたカルボキシ基またはカルバミン基および1または2のヒドロカルビル基により、ナイトライト基またはハロゲンにより置換されたカルバミン基により場合により置換され得る。ヒドロカルビルラジカルを含む上記基のうち、これらは、好ましくは最大で6の炭素原子を有するアルキルのような低級脂肪族であるべきである。そのようなアルコールは、酸素、窒素、および硫黄原子等のヘテロ原子により、炭素原子鎖中でさえぎられ得る。

上述の官能基の1または2で置換されたアルコールを選択することが好ましい

本発明の目的に好ましい上記基のアルコールは最大で12、特に最大で6の炭素原子を有するものであり、該アルコールにおいて、上述のアミノ、エーテル、エステル、チオエーテル、チオエステル、アセタール、ケタール基におけるヒドロカルビルラジカルは、最大で4の炭素原子を有するアルキル基であり、エステル化されたカルボキシ基または置換されたカルボミド基またはヒドロカルビル基においても同数の炭素原子を有するアルキルであり、アミノまたはカルバミン基は最大で8の炭素原子を有するアルキレンアミンまたはアルキレンカルバミン基であり得る。これらのアルコールのうち、特に興味があるのは、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルアルコール、*n*-ブチルアルコール、イソブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、アミルアルコール、ペンチル、ヘキシル、オクチル、ノニルおよびドデシルアルコールのような飽和および非置換のアルコール、そして特に *n*-オクチルおよび *n*-ドデシルのような直鎖アルコールである。この群の置換アルコールの中で好ましいものは、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール等の2価アルコール、グリセリン等の3価アルコール、タートロニックアルコール等のアルデヒドアルコール、乳酸、グリコール酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸等のカルボキシアルコール、アミノエタノール、アミノプロパノール、*n*-アミノプロパノール、*n*-アミノブタノール等のアミノアルコールおよびアミノ基におけるそれらのジメチルおよびジエチル誘導体、コリン、ピロジニルエタノール、ピベリジニルエタノール、ピペラジニルエタノール、および *n*-プロピルまたは *n*-ブチルアルコールの対応する誘導体、モノチオエチレングリコールおよびそのアルキル誘導体、例えばメルカプト基におけるエチレン誘導体である。

高級脂肪族アルコールのうち次のものが例である：セチルアルコールおよびミリスチルアルコール。しかし本発明の目的に特に重要であるのは、シトロネロール、ゲラニオール、ネロール、ネロリドール、リナロオール、ファルネスオール、フィトール等の、多くの必須油中に含まれテルペンと親和性を有するもののような、1または2の2重結合を有する高級不飽和アルコールである。低級不飽和

アルコールのうち、考慮すべきものはアリルアルコールおよびプロパギルアルコールである。

アルアリファティックアルコールのうち、好ましいものは、1のみのベンゼン環を有し、脂肪族鎖が最大で4の炭素原子を有し、ベンゼン残基が、1～3のメチルまたはヒドロキシ基によって、またはハロゲン原子、特に塩素、臭素、ヨウ素によって置換されていてもよく、脂肪族鎖は、遊離のアミノ基またはモノ若しくはジメチル基よりなる群から選択される1以上の官能基により、またはピロリジン基若しくはピペリジン基により置換されていてもよいものである。これらのアルコールのうち最も好ましいものはベンジルアルコールおよびフェネチルアルコールである。

脂環式すなわち脂肪族の環式脂肪族シリーズのアルコールは1または多環の炭化水素に由来し得て、好ましくは最大で34の炭素原子を好ましくは有し得て、非置換であってもよく、脂肪族アルコールについて上で述べたもののような1以上の置換基を有してもよい。単一環の炭化水素に由来するアルコールのうち好ましいものは、最大で12の炭素原子を有するものであり、環は好ましくは5～7の炭素原子を有し、例えばメチル、エチル、プロピルまたはイソプロピル基のような、1～3個の低級アルキル基により置換されていてもよい。この群に特別なアルコールとして、シクロヘキサノール、シクロヘキサンジオール、1, 2, 3シクロヘキサントリオールおよび1, 3, 5シクロヘキサントリオール（フロログルシトール）、イノシトールを、カルボメントール、メントール、 α および γ -ターピネオール、1-ターピネオール、4-ターピネオールおよびビベリトールのようなp-メンタンに由来するアルコール、「ターピネオール」、1, 4および1, 8-ターピンのようなこれらのアルコールの混合物を述べるべきである。縮合環を有する炭化水素に由来するアルコール、例えばスジャン、ピナンまたはカルファン基のアルコールのうち、スジャンノール、サビノール、ピノール水和物、DおよびL-ボルネオール並びにDおよびL-イソボルネオールも有用である。

本発明のエステルに用いる脂肪族一環式脂肪族多環アルコールは、性ホルモン

およびそれらの合成アナログのようなステロール、コール酸およびステロイド、特にコルチコステロイドおよびその誘導体である。従って、例えばコレステロール、ジヒドロコレステロール、エビジヒドロコレステロール、コプロスタノール、エビコプロスタノール、シストステロール、スティグマステロール、エルゴステ

ロール、コール酸、デオキシコール酸、リソコール酸、エステリオール、エストラジオール、エクイレニン、エクイリンおよびそれらのアルキル誘導体、そしてまた17位におけるエチニルまたはプロビニル誘導体、例えば17- α -エチニル-エストラジオールまたは7- α -メチル-17- α -エチニル-エストラジオール、プレグネノロン、プレグナネジオール、テストステロンおよびその誘導体、例えば17- α -メチルテストステロン、1,2-デヒドロテストステロンおよび17- α -メチル-1,2-デヒドロテストステロン、テストステロンおよび1,2-デヒドロテストステロンの17位におけるアルキニル誘導体、例えば17- α -エチニルテストステロン、17- α -プロビニルテストステロン、ノルゲステレル、ヒドロキシプロゲステロン、コルチコステロン、デオキシコルチコステロン、19-ノルテストステロン、19-ノル-17- α -メチルテストステロンおよび19-ノル-17- α -エチニル-テストステロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニソロン、フルドロコルチゾン、デキサメタゾン、 β -メタゾン、パラメタゾン、フルメタゾン、フルオシノロン、フルプレドニリデン、クロベタゾール、ベクロメタゾン、アルドステロン、デスオキシコルティコステロン、アルファキサロン、アルファアドロン、ボラストロンを用いることが可能である。

本発明のエステルに有用なエステル化成分は、ジギトキシゲニン、ジトロキシゲニン、ジゴキシゲニン、ストロファンチジン、チゴゲニン、サボニンのような心臓作用性のグリコシドのゲニン（アグリコン）である。

本発明により用いられる他のアルコールは、アクセロフトール、ビタミンD₂およびD₃、アネウリン、ラクトフラビン、アスコルビン酸、リボフラビン、チアミン、パントテン酸のようなビタミンアルコールである。

脂環式または脂肪族-脂環式アルコールの直鎖または環鎖が、1以上の、例えば1～3の、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N$ および $-NH$ よりなる群から選択されるヘテロ原子によりさえぎられ、これらにおいて1以上の不飽和結合、例えば2重結合、特に2～3があり、芳香族構造を有する複素環式化合物を含むなら、複素環式アルコールは、上述の脂環式または脂肪族-脂環式アルコールの誘導体と考えられ得る。次のものが具体的な有用な例である：フルフリルアルコール、アルカロイ

ドおよび誘導体、例えばアトロピン、スコボルアミン、シンコニン、シンコニンデナ、キニン、モルフィン、コデイン、ナロルフィン、N-ブチルスコボルアンモニウムブロマイド、アジュマリン；フェニルエチルアミン、例えばエフェドリン、イソプロテレノール、エピネフリン；フェノチアジン剤、例えば、ベルフェナジン、ピボチアジン、カルフェナジン、ホモフェナジン、アセトフェナジン、フルフェナジン、N-ヒドロキシエチルプロメタジンクロライド；チオキサンテン剤、例えばフルベンチゾールおよびクロベンチキソール；抗けいれん剤、例えばメプロフェンジオール、抗精神病薬、例えばオピプラモール；抗嘔吐剤、例えばオキシベンジル；鎮痛剤、例えば、カルベチジンおよびフェノペリジンおよびメタドール；催眠薬例えばエトドロキシジン；食欲抑制剤、例えばベンズヒドロールおよびジフェメトキシジン；温和なトランキライザー、例えばヒドロキシジン；筋弛緩剤、例えばシンナメドリン、ジフィリン、メフェネシン、メトカルバモール、クロールフェネシン、2-2-ジエチル-1, 3-プロパンジオール、グアイフェネシン、イドロシルアミド；冠状血管拡張薬、例えばジピリダモールおよびオキシフェドリン；アドレナリン作用性ブロッカー、例えばプロパノロール、チモロール、ピンドロール、ブランノロール、アテノロール、メトプロロール、プラクトロール；抗腫瘍剤、例えば6-アザウリジン、シタラビン、フロクスリジン；抗生物質、例えばクロラムフェニコール、チアムフェニコール、エリスロマイシン、オレアンドマイシン、リンコマイシン；抗ウイルス剤、例えばヨードクスリジン；末梢血管拡張剤、例えばイソニコチニルアルコール；カルボニックアンヒドラーゼ阻害剤、例えばスロカルビレート；抗ぜん息剤および抗炎症

剤、例えばチアラミド；フルファミド、例えば2-p-スルファニルアニリノエタノール。

2. ヒアルロン酸

本発明では、ヒアルロン酸（HA）は、ACP誘導体を製造するための出発物質として、またはACP誘導体と組み合わせて第2の成分として働く。架橋結合したHAには、出発物質としていずれかの天然のまたは合成されたHAを用いることができる。

ヒアルロン酸の基質は、例えば雄鶏のとさか由来の、上記の天然の出発物質か

ら抽出された酸などの、いずれの起源のものでもよい。本発明のACP/HA製剤には、細菌（WO 95/04132）または動物（EP 0138572；WO 92/18543）の供給源から単離されたヒアルロン酸、またはin vitroでの酵素的合成（WO 95/24497）により製造されたヒアルロン酸が用いられる。本発明によれば、例えば酸全体としての分子量の90～80%から0.2%の間、好ましくは5～0.2%の間の広い分子量範囲を有する有機材料の抽出によって直接得られた、酸全体の分子の画分を構成しているヒアルロン酸を使用することが好ましい。これらの画分は、文献に記載された様々な方法によって得ることができ、それらの方法は、加水分解、酸化、もしくは酵素的化学作用、または例えば機械的なもしくは照射による方法などの物理的方法であって、しばしば同じ精製手順の間に最初の抽出物が形成し得る。得られた分子の画分の分離と精製は、分子ろ過のような既知の手段によって行われる。本発明にしたがって使用するのに適当な、精製されたHY画分の1つは、例えば「非炎症性-NIF-NaHAナトリウムヒアルロン酸塩」として知られているものであり、Balazsがパンフレット“Healon” - A guide to its use in Ophthalmic Surgery - D. Miller & R. Stegmann, eds. John Wiley & Sons N.Y. 81983:p. 5において記載しているものである。

さらに、ACPエステルの出発物質として特に重要なものは、ヒアルロン酸から得ることができる2つの精製された画分、例えば「ヒアラスチン」および「ヒアレクチン」という名で知られる雄鶏のとさかから抽出されたものである。

ヒアラスチン画分は平均分子量が約50,000~100,000であり、一方ヒアレクチン画分は平均分子量が約500,000~730,000である。さらに、これら2つの画分が組み合わさった1つ画分も単離されており、平均分子量が約250,000~約350,000の間であると特徴付けられている。この一緒にした画分は、特定の出発物質において利用できる総ヒアルロン酸の80%の収率で得ることができ、一方、ヒアレクチン画分は30%の収率で、そしてヒアラスチン画分は50%の収率で出発のHYから得ることができる。これら画分の製造は、上述の欧州特許公開公報第0138572A3に記載されている。

本発明を、その範囲をなんら限定することなく、以下に説明する実施例によっ

て説明する。

3. ACP誘導体の製造

実施例1:

架橋結合したヒアルロン酸(HY)の製造

生成物の記載:

内部エステル化に用いられる1%のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される99%のカルボキシル基

モノマー単位10meqに相当する分子量170,000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、25℃にてDMSO248mL中で可溶化し、トリエチルアミン0.01g(10meq)を加え、得られた溶液を30分間攪拌する。DMSO60mL中の2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド0.026g(0.1meq)の溶液を、1時間かけて1滴ずつゆっくりと加え、混合物を30℃で15時間保つ。

次いで、水100mLと塩化ナトリウム2.5gによって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン750mLにゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100mLのアセトン/水5:1で3回洗浄し、アセトン100mLで3回洗浄し、最後に30℃にて24時間真空乾燥する。

標題の化合物3.97gが得られる。エステル基の定量分析は、“Quantitativ

e Organic Analysis Via Functional Groups", 4th Edition John Willey and Sons Publicationの169～172頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例2:

架橋結合したヒアルロン酸(HY)の製造

生成物の記載:

内部エステル化に用いられる5%のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される95%のカルボキシル基

モノマー単位10meqに相当する分子量85,000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、25℃にてDMSO248mL中で可溶化し、トリエチルアミン0.051g(0.5meq)を加え、得られた溶液を30分間攪拌する。

DMSO60mL中の2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨード0.128g(0.5meq)の溶液を、1時間かけて1滴ずつゆっくりと加え、混合物を30℃で15時間保つ。

次いで、水100mLと塩化ナトリウム2.5gによって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン750mLにゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100mLのアセトン/水5:1中で3回洗浄し、アセトン100mLで3回洗浄し、最後に30℃にて24時間真空乾燥する。

標題の化合物3.95gが得られる。エステル基の定量分析を、

"Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups" 4th Edition John Willey and Sons Publicationの169～172頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例3:

架橋結合したヒアルロン酸(HY)の製造

生成物の記載:

内部エステル化に用いられる10%のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される90%のカルボキシル基

モノマー単位 10 meq に相当する分子量 620,000 の H₂Y テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g を、25℃ にて DMSO 248 mL 中で可溶化し、トリエチルアミン 0.101 g (1.0 meq) を加え、得られた溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド 0.255 g (1.0 meq) の溶液を、1 時間かけて 1 滴ずつゆっくりと加え、混合物を 30℃ で 15 時間保つ。

次いで、水 100 mL と塩化ナトリウム 2.5 g によって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン 750 mL にゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mL のアセトン/水 5:1 中で 3 回洗浄し、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30℃ にて 24 時間真空乾燥

する。

標題の化合物 3.93 g が得られる。エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publication の 169 ~ 172 頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例 4 :

架橋結合したヒアルロン酸 (HY) の製造

生成物の記載 :

内部エステル化に用いられる 25% のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される 75% のカルボキシル基

モノマー単位 10 meq に相当する分子量 170,000 の H₂Y テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g を、25℃ にて DMSO 248 mL 中で可溶化し、トリエチルアミン 0.253 g (2.5 meq) を加え、得られた溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド 0.639 g (2.5 meq) の溶液を、1 時間かけて 1 滴ずつゆっくりと加え、混合物を 30℃ で 15 時間保つ。

次いで、水100 mLと塩化ナトリウム2.5 gによって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン750 mLにゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mLのアセトン/水5:1中で3回洗浄し、アセトン100 mLで3回洗浄し、最後に30℃にて24時間真空乾燥する。

標題の化合物3.85 gが得られる。エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publicationの169～172頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例5:

架橋結合したヒアルロン酸(HY)の製造

生成物の記載:

内部エステル化に用いられる50%のカルボキシル基
ナトリウムにより塩化される50%のカルボキシル基

モノマー単位10 meqに相当する分子量85,000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.21 gを、25℃にてDMSO248 mL中で可溶化し、トリエチルアミン0.506 g (5.0 meq)を加え、得られた溶液を30分間攪拌する。

DMSO60 mL中の2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨード1.28 g (5 meq)の溶液を、1時間かけて1滴ずつゆっくりと加え、混合物を30℃で15時間保つ。

次いで、水100 mLと塩化ナトリウム2.5 gによって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン750 mLにゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mLのアセトン/水5:1中で3回洗浄し、アセトン100 mLで3回洗浄し、最後に30℃にて24時間真空乾燥する。

標題の化合物3.65 gが得られる。エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publicationの169～172頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例 6 :

架橋結合したヒアルロン酸 (HY) の製造

生成物の記載 :

内部エステル化に用いられる 70% のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される 25% のカルボキシル基

モノマー単位 10 meq に相当する分子量 170,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g を、25℃ にて DMSO 248 mL 中で可溶化し、トリエチルアミン 0.759 g (1.0 meq) を加え、得られた溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド 1.92 g (7.5 meq) の溶液を、1 時間かけて 1 滴ずつゆっくりと加え、混合物を 30℃ で 15 時間保つ。

次いで、水 100 mL と塩化ナトリウム 2.5 g によって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン 750 mL にゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。

沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mL のアセトン/水 5:1 中で 3 回洗浄し、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30℃ にて 24 時間真空乾燥する。

標題の化合物 3.54 g が得られる。エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publication の 169 ~ 172 頁に記載された鹼化法にしたが行う。

実施例 7 :

架橋結合したヒアルロン酸 (HY) の製造

生成物の記載 :

内部エステル化に用いられる 100% のカルボキシル基

モノマー単位 10 meq に相当する分子量 70,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g を、25℃ にて DMSO 248 mL 中で可溶化し、トリエチルアミン 1.012 g (10 meq) を加え、得られた溶液を 30 分間攪拌

する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド 2.55 g (10 meq) の溶液を、1 時間かけて 1 滴ずつゆっくりと加え、混合物を 30 °C で 15 時間保つ。

得られた混合物をアセトン 750 mL にゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mL のアセトンで 6 回洗浄し、最後に 30 °C にて 24 時間真空乾燥する。

標題の化合物 3.52 g が得られる。エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publication の 169 ~ 172 頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例 8 :

架橋結合したヒアルロン酸 (HY) の部分的エチルエステルの製造

生成物の記載 :

エタノールでエステル化された 25 % のカルボキシル基

内部エステル化に用いられる 25 % のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される 50 % のカルボキシル基

モノマー単位 10 meq に相当する分子量 170,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g を、25 °C にて DMSO 248 mL 中で可溶化し、ヨウ化エチル 0.390 g (2.5 meq) を加え、溶液を 30 °C で 12 時間保つ。トリエチルアミン 0.253 g (2.5 meq) を加え、溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド 0.639 g (2.5 meq) の溶液を、1 時間かけて 1 滴ずつゆっくりと加え、混合物を 30 °C で 15 時間保つ。

次いで、水 100 mL と塩化ナトリウム 2.5 g によって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン 750 mL にゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mL のアセトン/水 5 : 1 中で 3 回洗浄し、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30 °C にて 24 時間真空乾

燥する。

標題の化合物 3.84 g が得られる。エトキシ基の定量分析は、R. H. Cundiff および P. C. Markunas の方法 (Anal. Chem. 33, 1028-1930 (1961)) にしたがって行う。全エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Wiley and Sons Publication の 169 ~ 172 頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例 9 :

架橋結合したヒアルロン酸 (HY) の部分的エチルエステルの製造

生成物の記載 :

エタノールでエステル化された 50 % のカルボキシル基

内部エステル化に用いられる 25 % のカルボキシル基

ナトリウムにより塩化される 25 % のカルボキシル基

モノマー単位 10 meq に相当する分子量 85,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g を、25℃ にて DMSO 248 mL 中で可溶化し、ヨウ化エチル 0.780 g (5.0 meq) を加え、溶液を 30℃ で 12 時間保つ。トリエチルアミン 0.253 g (2.5 meq) を加え、溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド 0.639 g (2.5 meq) の溶液を、1 時間かけて 1 滴ずつゆっくりと加え、混合物を 30℃ で 15 時間保つ。

次いで、水 100 mL と塩化ナトリウム 2.5 g によって形成された溶液を加えた後、得られた混合物をアセトン 750 mL にゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、次いでこれをろ過し、100 mL のアセトン/水 5 : 1 中で 3 回洗浄し、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30℃ にて 24 時間真空乾燥する。

標題の化合物 3.87 g が得られる。エトキシ基の定量分析は、R. H. Cundiff および P. C. Markunas の方法 (Anal. Chem. 33, 1028-1930 (1961)) にしたがって行う。全エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Func

tional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publicationの169～172頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例10:

架橋結合したヒアルロン酸(HY)のエチルエステルの製造

生成物の記載:

エタノールでエステル化された75%のカルボキシル基

内部エステル化に用いられる25%のカルボキシル基

モノマー単位10meqに相当する分子量170,000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.21gを、25℃にてDMSO248mL中で可溶化し、ヨウ化エチル1.17g(7.5meq)を加え、溶液を30℃で12時間保つ。トリエチルアミン0.253g(2.5meq)を加え、溶液を30分間攪拌する。

DMSO60mL中の2-クロロ-1-メチルピリジニウムヨージド0.639g(2.5meq)の溶液を、1時間かけて1滴ずつゆっくりと加え、混合物を30℃で15時間保つ。

得られた混合物をアセトン750mLにゆっくりと注ぎ、攪拌し続ける。沈殿が形成し、これをろ過し、100mLのアセトンで5回洗浄し、最後に30℃にて24時間真空乾燥する。

標題の化合物3.91gが得られる。エトキシ基の測定は、R. H. CundiffおよびP. C. Markunas(Anal. Chem. 33, 1028-1930(1961))の方法にしたがって行う。全エステル基の定量分析は、“Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups” 4th Edition John Willey and Sons Publicationの169～172頁に記載された鹼化法にしたがって行う。

実施例11

架橋ヒアルロン酸(HY)の部分コーチゾンエステル(C21)の製造

生成物の説明:

コーチゾンでエステル化したカルボキシ基20%。

分子内エステル化に使用したカルボキシ基25%。

ナトリウムで塩化したカルボキシ基 55%。

分子量 70,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g (モノマー単位の 10 meq に相当する) を 25°C の DMSO 248 mL に溶解する。21-ブromo-4-プレグネン-17- α -オール-3,11,20-トリオン 0.85 g (2 meq) および得られた溶液を 24 時間 30°C に保つ。トリエチルアミン 0.253 g (2.5 meq) を加え、得られた溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチル-ピリジニウムヨウ化物 0.639 g の溶液を 1 時間かけて徐々に滴加し、混合物を 15 時間 30°C に保つ。

次に、水 100 mL および塩化ナトリウム 2.5 g で形成された溶液を加え、次いで、連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン 750 mL に徐々に注ぎ入れる。沈殿物が形成され、次いでこれを濾過し、アセトン/水 (5:1) 100 mL で 3 回、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30°C で 24 時間減圧乾燥する。

標記化合物 4.5 g を得る。B.P. に従って、コーチゾン を定量し、 Na_2CO_3 の含水アルコール溶液で加水分解し、クロロホルムで抽出する。

全エステル基の定量は、「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第 4 版 (John Wiley and Sons Publication) の 169-172 頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

実施例 12

架橋ヒアルロン酸 (HY) の混合エタノールおよびコーチゾン部分エステル (C21) の製造

生成物の説明:

コーチゾンでエステル化したカルボキシ基 20% (C21)。

エタノールでエステル化したカルボキシ基 25%。

分子内エステル化に使用したカルボキシ基 25%。

ナトリウムで塩化したカルボキシ基 30%。

分子量 85,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g (モノマー単位の 10 meq に相当する) を 25°C の DMSO 248 mL に溶解する。エチ

ルヨウ化物 0.39 g (2.5 mEq) を加え、得られた溶液を 12 時間 30℃ に保つ。21-ブromo-4-ブregネン-17- α -オール-3, 11, 20-トリオン 0.85 g (2 mEq) を加え、得られた溶液を 24 時間 30℃ に保つ。トリエチルアミン 0.253 g (2.5 mEq) および得られた溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 60 mL 中の 2-クロロ-1-メチル-ビリジニウムヨウ化物 0.639 g (2.5 mEq) の溶液を 1 時間かけて徐々に滴加し、混合物を 15 時間 30℃ に保つ。

次に、水 100 mL および塩化ナトリウム 2.5 g で形成された溶液を加え、次いで、連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン 750 mL に徐々に注ぎ入れる。沈殿物を形成させ、次いでこれを濾過し、アセトン/水 (5:1) 100 mL で 3 回、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30℃ で 24 時間減圧乾燥する。

標記化合物 4.41 g を得る。B. P. に従ってコーチゾン进行定量し、 Na_2CO_3 の含水アルコール溶液で加水分解し、クロロホルムで抽出する。

エトキシ基の定量は、R.H.Cundiff および P.C.Markunas (Anal.Chem. 33, 1028-1930 (1961)) の方法に従って行なわれる。全エステル基の定量は、

「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第 4 版 (John Wiley and Sons Publication) の 169-172 頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

実施例 13

架橋ヒアルロン酸 (HY) の混合エタノールおよびコーチゾンエステル (C21) の製造

生成物の説明:

コーチゾンでエステル化したカルボキシ基 20% (C21)。

エタノールでエステル化したカルボキシ基 70%。

分子内エステル化に使用したカルボキシ基 10%。

分子量 170,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g (モノマ

一単位の10 mEqに相当する)を25℃のDMSO 248 mLに溶解する。エチルヨウ化物1.09 g (7 mEq)を加え、得られた溶液を12時間30℃に保つ。21-ブromo-4-ブregネン-17- α -オール-3, 11, 20-トリオン0.85 g (2 mEq) および得られた溶液を24時間30℃に保つ。トリエチルアミン0.101 g (1.0 mEq) および得られた溶液を30分間攪拌する。

DMSO 60 mL中の2-クロロ-1-メチル-ビリジニウムヨウ化物0.255 g (1.0 mEq)の溶液を1時間かけて徐々に滴加し、混合物を15時間30℃に保つ。

連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン750 mLに徐々に注ぎ入れる。沈殿物を形成させ、次いでこれを濾過し、アセトン100 mLで5回洗浄し、最後に30℃で24時間減圧乾燥する。

標記化合物4.58 gを得る。B. P.に従ってコーチゾンを定量し、Na₂CO₃の含水アルコール溶液で加水分解し、クロロホルムで抽出する。

エトキシ基の定量は、R.H.CundiffおよびP.C.Markunas(Anal.Chem. 33,1028-1930(1961))の方法に従って行なわれる。全エステル基の定量は、

「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第4版(John Wiley and Sons Publication)の169-172頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

実施例14

架橋ヒアルロン酸の塩のカナマイシンを用いる製造

生成物の説明:

分子内エステル化に用いられるカルボキシ基25%。

カナマイシンと結合したカルボキシ基75%。

ヒアルロン酸の部分テトラブチルアンモニウム塩4.39 g (モノマー単位の10 mEqに相当する)を25℃のDMSO 248 mLに溶解し、トリエチルアミン0.253 g (2.5 mEq)を加え、得られた溶液を30分間攪拌する。

DMSO 60 mL中の2-クロロ-1-メチル-ビリジニウムヨウ化物0.6

3.9 g (2.5 meq) の溶液を1時間かけて徐々に滴加し、混合物を15時間30℃に保つ。

連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン750 mLに徐々に注ぎ入れる。沈殿物を形成させ、次いでこれを濾過し、アセトン100 mLで5回洗浄し、最後に30℃で24時間減圧乾燥する。

沈殿物を蒸留水400 mLに懸濁させ、5℃に冷却し、次いで、30分間攪拌しながら、蒸留水25 mLに硫酸カナマイシン1.1 g (7.5 meq) を溶解し、第4級アンモニウム樹脂 (Dowex 1x8) OH-型15 mLを含むカラムで溶出して得られた溶液を加える。得られた混合物を凍結乾燥する。

標記化合物4.6 gを得る。エステル基の定量は、「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第4版 (John Wiley and Sons Publication) の169-172頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

カナマイシンの微生物学的定量はB.subtilis 6633を用い、カナマイシンの標準品との比較により実施する。

実施例 15

架橋ヒアルロン酸塩のアミカシンを用いる製造

生成物の説明：

分子内エステル化に用いられるカルボキシ基25%。

アミカシンと結合したカルボキシ基75%。

ヒアルロン酸の部分テトラブチルアンモニウム塩 (25%) 4.39 g (モノマー単位の10 meqに相当する) を25℃のDMSO 248 mLに溶解し、トリエチルアミン0.253 g (2.5 meq) を加え、得られた溶液を30分間攪拌する。

DMSO 60 mL中の2-クロロ-1-メチル-ピリジニウムヨウ化物0.639 g (2.5 meq) の溶液を1時間かけて徐々に滴加し、混合物を15時間30℃に保つ。

連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン750 mLに徐々に注ぎ入れる。沈殿物を形成させ、次いでこれを濾過し、アセトン100 mLで5回洗浄

し、最後に30℃で24時間減圧乾燥する。

沈殿物を蒸留水400 mLに懸濁させ、5℃に冷却する。

30分間一定に攪拌しながら塩基性アミカシン1.1 g (7.5 mEq)を加える。得られた混合物を凍結乾燥する。

標記化合物4.8 gを得る。エステル基の定量は、「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第4版 (John Wiley and Sons Publication) の169-172頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

アミカシンの定量はS.aureus 29737を用い、カナマイシンの標準品との比較により微生物学的に行なう。

実施例 16

架橋ヒアルロン酸 (HY) の部分エチルエステルの製造

生成物の説明：

エタノールでエステル化したカルボキシ基50%。

分子内エステル化に使用したカルボキシ基10%。

ナトリウムで塩化したカルボキシ基40%。

分子量85,000のHYテトラブチルアンモニウム塩6.21 g (モノマー単位の10 mEqに相当する)を25℃のDMSO 248 mLに溶解し、エチルヨウ化物0.780 g (5.0 mEq)を加え、該溶液を12時間30℃に保つ。ヒリジン塩化物0.118 g (1 mEq)を加え、得られた溶液を30分間攪拌する。

DMSO 20 mL中のN-ベンジル-N'-エチルカルボジイミド0.16 g (1 mEq)の溶液を1時間かけて徐々に滴加し、混合物を45時間30℃に保つ。

次に、水100 mLおよび塩化ナトリウム2.5 gで形成された溶液を加え、次いで、連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン750 mLに徐々に注ぎ入れる。沈殿物を形成させ、次いでこれを濾過し、アセトン/水(5:1)100 mLで3回、アセトン100 mLで3回洗浄し、最後に30℃で24時間減圧乾燥する。

標記化合物 3.85 g を得る。エトキシ基の定量は、R.H.Cundiff および P.C. Markunas (Anal. Chem. 33, 1028-1930 (1961)) の方法に従って行なわれる。全エステル基の定量は、「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第4版 (John Wiley and Sons Publication) の 169-172 頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

実施例 17

架橋ヒアルロン酸 (HY) の製造

分子内エステル化に使用したカルボキシ基 10%。

ナトリウムで塩化したカルボキシ基 90%。

分子量 170,000 の HY テトラブチルアンモニウム塩 6.21 g (モノマー単位の 10 meq に相当する) を 25℃ の DMSO 248 mL に溶解し、ピリジン塩化物 0.118 g (1 meq) を加え、得られた溶液を 30 分間攪拌する。

DMSO 20 mL 中の N-ベンジル-N'-エチルカルボジイミド 0.16 g (1 meq) の溶液を 1 時間かけて徐々に滴加し、混合物を 45 時間 30℃ の温度に保つ。

次に、水 100 mL および塩化ナトリウム 2.5 g で形成された溶液を加え、次いで、連続的に攪拌しながら、得られた混合物をアセトン 750 mL に徐々に注ぎ入れる。沈殿物を形成させ、次いでこれを濾過し、アセトン/水 (5:1) 100 mL で 3 回、アセトン 100 mL で 3 回洗浄し、最後に 30℃ の温度で 24 時間減圧乾燥する。

標記化合物 3.9 g を得る。全エステル基の定量は、「Quantitative Organic Analysis Via Functional Groups」第4版 (John Wiley and Sons Publication) の 169-172 頁に記載の加水分解方法に従って実施される。

4. 本発明による製剤例

実施例 18

架橋ヒアルロン酸を主体とする活性物質を含む注射用懸濁剤 (ACP) の製造

2 mL バイアル 1 本中に以下の成分を含む。

自己架橋ヒアルロン酸 (ACP)	20 mg
塩化ナトリウム	17 mg
リン酸1ナトリウム・2水和物	0.1 mg
リン酸2ナトリウム・12水和物	1.2 mg
注射用水	2 mL

実施例 19

自己架橋ヒアルロン酸およびヒアルロン酸ナトリウム塩の75/25混合物からなる活性物質を含む注射用懸濁剤の製造

2 mL 充填シリンジ 1 本中に以下の成分を含む。

自己架橋ヒアルロン酸 (ACP)	15 mg
ヒアルロン酸ナトリウム塩 (ヒアレクチン)	5 mg
塩化ナトリウム	17 mg
リン酸1ナトリウム・2水和物	0.1 mg
リン酸2ナトリウム・12水和物	1.2 mg
注射用水	2 mL

実施例 20

メチルプレドニゾロン21-スクシネートナトリウム塩のような抗炎症剤をビークルとし、自己架橋ヒアルロン酸を主体とする活性物質を含む注射用懸濁剤の製造

2 mL 充填シリンジ 1 本中に以下の成分を含む。

自己架橋ヒアルロン酸 (ACP)	20 mg
メチルプレドニゾロン21-スクシネートナトリウム塩	10 mg
塩化ナトリウム	18 mg
注射用水	2 mg

実施例 21

リン酸トリアムシノロンナトリウム塩のような抗炎症剤をビークルとし、自己架橋ヒアルロン酸およびヒアルロン酸ナトリウム塩の75/25混合物からなる活性物質を含む注射用懸濁剤の製造

2 mL バイアル 1 本中に以下の成分を含む。

自己架橋ヒアルロン酸 (ACP)	15 mg
ヒアルロン酸ナトリウム塩 (ヒアレクチン)	5 mg
リン酸トリアムシノロンナトリウム塩	20 mg

塩化ナトリウム	18 mg
注射用水	2 mg

5. 本発明にしたがう製剤についての試験

実施例 22 :

ACP成分が呼称5%程度まで自己架橋されているACP/HA製剤の調製

500-730 kDaの範囲の分子量のHAを5%の呼称レベルまで架橋した。

リン酸緩衝液 (NaCl 0.15 M、リン酸塩 0.002 M) pH=6.5 中、0/100~100/0%の範囲で種々の割合のACP/HAを混合することにより、最終濃度 1 w/w%でACP/HA製剤を調製した。懸濁物を24時間膨潤させた。

ACP/HA混合物のレオロジー的性質はいくつかの形状寸法 (50 mm直径の平行プレート: 1 mmまたは2 mm間隔、およびクエット: カップ直径 34 mm、ボブ (bob) 直径および長さそれぞれ 32) に合わせたレオメトリックス液体分析装置 (RFS-8500) で温度を 25 °C に固定して測定した。振動剪断測定 (通常、10% ひずみ値で) から、0.01-100 rad/秒の周波数範囲にわたって粘弾性パラメータ G' (貯蔵弾性率), G'' (損失弾性率) および η^* (複素粘度) を得た。

十分高いポリマー濃度で拡散させ、水性培地中で膨潤させたACPは粘弾性で、透明な固体様系を形成することが測定によって示された。第2A図に報告した粘弾性スペクトル (ACP/HA 100/0) は明らかにゲル様性質を示した。特に、研究した全範囲の周波数において $G'(\omega) > G''(\omega)$ であり、 G' および G'' は両方ともわずかに周波数依存性である。比 G'/G'' (\tan) は 2 rad/秒より低い周波数では一定値 (0.3) に達し、周波数が増加するにつれてわずかに増加 (0.4 まで) する。複素粘度、 η^* は研究した全範囲の周波数にお

いて指数法則にしたがい、周波数に強く依存する。見かけの指数法則の指数は ≈ 0.82 である。

同じ適用ひずみ（0.1ひずみ単位）を用いることによって、両弾性率および複素粘度（粘弾性ではない）の測定絶対値は、用いる形状寸法に影響されることが認められる。この現象は系の非均一性を反映する。ACP（100/0）のゲル様反応はHA出発物質に典型的な絡み合いネットワーク性質とは大きく異なっている（Kobayashi Y.ら、Biorheology, 1994, 31, 235-244）。

第2D図（ACP/HA 0/100）に見られるように、機械的スペクトルは $G''(\omega) > G'(\omega)$ を示し、末端領域では $G' \propto \omega^2$ および $G'' \propto \omega$ を示す。さらに、 $\eta^*(\omega)$ は本質的に周波数と無関係である。総ポリマー濃度を一定（1% w/w）に保ちながら、異なる比で2つのポリマーを混合することによって、広い範囲の2成分系を得ることができる。特に、HAリッチ混合物（ACP/HA 30/70）は、拡散成分が膨潤ACPの分離した粒子によって構成され、連続成分がHA水溶液である懸濁物とみなすことができる。逆に、ACPリッチ混合物（ACP/HA 75/25）は、連続成分が、HA水溶液によって構成される拡散成分よりずっと堅い「混成物」と考えることができる。

上記の系の機械的応答は連続成分の粘弾性に左右されることが予想される。実際に、HAリッチ混合物の粘弾性スペクトル（第2C図、30/70）は、研究した全範囲の周波数において液状物様性質を示す。しかし、HA単独（第2D図）と比べて G' および G'' は特に通常の歩行速度での関節運動に相当する周波数が含まれる末端領域において高められている（ G' の場合には顕著に増加）。その一方、ACPリッチ混合物の粘弾性スペクトル（第2B図、75/25）は、特に低周波数において両弾性率が減少していることを除いて、ACP単独の性質と類似するゲル様性質を示す。この場合、 G' および G'' はより高い周波数依存性を示す。両混合物で観察された低周波数での変化は、培地中の2成分の弾性率間の大きな相違を反映している。

第3図にはっきりと示されるように、およそ歩行の際の関節運動に相当する周波数（0.72 rad/秒）（Kobayasiら、Biorheology, 1994, 上記）、およ

び $T = 25^{\circ}\text{C}$ で、 G' および G'' は混合物の ACP 含量の関数として互いに交叉する。特に、混合物中の 50 w/w % ACP 含量にほぼ対応して液状物様から固形物様性質への「遷移」が生じることは明らかである。

第 4 図は、100/0 ~ 0/100 の範囲の ACP/HA 比を有する ACP/HA 製剤の動的粘度の比較を示す。ACP 含量の増加に伴い、組成物の粘弾性が改良されることがはっきりとわかる。

実施例 23 :

ACP 成分が種々の程度に自己架橋される ACP/HA 製剤の調製および試験

ヒアルロン酸 (HA) (640,000 Da) から合成し、以下のもの：

ACP 20%	0.5% 水
ACP 10%	0.5% 水
ACP 5%	0.5% 水

を含む ACP/HA 混合物を調製するのに用いる自己架橋カルボキシルポリサッカライド (ACP)。

値 20、10 および 5 % は呼称エステル化パーセントを表し、一方 0.5 % は合成の間に加えた水の量を示す。

リン酸緩衝液 (NaCl 0.15 M および リン酸塩 0.002 M) $\text{pH} = 6.5$ 中、異なる量の ACP および HA (640,000 Da) を混合することによって製剤を調製した。混合物はすべて、最終濃度 10 mg/mL とし、ACP/HA 比 100/0 - 0/100 % の範囲で調製した。この懸濁物を 24 時間膨潤させた後、孔サイズ 100 - 40 μm のガラスフィルターでろ過した。

レオロジー的測定は「液体分析装置 RFS 8500」レオメーター (レオメトリックス) で行った。寸法形状は溶液の粘度にしたがって選択した：かなり粘性の溶液にはパラレルプレート (2 mm 間隔)、およびわずかに粘性の溶液にはクエット (1 mm 間隔)。

研究は動的周波数スイープ (sweep) で行った (範囲 = 100 - 0.05 rad/秒、ひずみ = 10 %、 $T = 25^{\circ}\text{C}$)。

ACP/HA 100/0 で構成される製剤は一般に、考えられる全周波数範囲

において G'' より高い G' によって特徴付けられる。架橋程度を一定に保ちながら、混合物中により多量のHAを加えると、粘度の値はより低くなる一方、 G' および G'' は互いにより近接する傾向がある（第6図）。

特に50%ACP含量の製剤の場合には、研究されるACPのタイプにしたがい、1つまたは2つの異なる周波数に対応して G' および G'' は重なり、交叉する（第7図、第8図）。

第9、10および11図は異なるACP/HA比のACP/HA製剤の粘度に対するエステル化パーセントの効果を示す。

粘弾性スペクトルから、高ACP含量（例えば100/0）のACP/HA製剤に対し、粘度パターンは20%>10%>5%型であり（第9図）、一方50/50混合物に対し、結果は20%>5%>10%である（第10図）と結論を下すことができる。ACP20%およびACP5%から出発したACP/HA40/60混合物は、最終的にほんのわずかな粘度の相違を示した（第11図）。

課題が高い粘弾性値に達することである場合、高い程度に架橋されたACP（ACP20%）単独（100/0）または少量のヒアルロン酸との混合物（例えば75/25）を用いるべきである。一方、所望の粘弾性値が高くない場合（ACP/HA40/60、30/70）は、架橋パーセントはさほど重要な要因ではない。

上記の結果はHAを架橋してACPを形成することは非修飾HAと比べて優れた粘弾性を有するHA誘導体を生じることを示す。さらにACPのレオロジー的性質は種々の重量/重量比のACP/HA混合物からなる組成物を調製することによって調節できる。

医薬賦形剤中に製剤化したACPはゲル様のレオロジーのプロファイルを表すが、種々の量のACP10%100/0を非骨関節炎ウマ由来の滑液と混合することによって興味深い結果が得られている。

第12、13図はそれぞれ、10mg/mLの濃度で医薬賦形剤中に製剤化したウマ滑液およびACP10%100/0のレオロジーのプロファイルを示す。

ACP10%と最終濃度3.3の滑液および5mg/mLのACPゲルとの混

合物（第14および15図）は滑液のみと比べた場合、すべての粘弾性パラメータの決定的な増加を示すことのみならず、ACPのみと比べた場合、理論的に理想的なレオロジーのプロファイルを示す。実際、ACPに基づく製剤において平行する G' および G'' は、滑液の存在下、ACP添加量にしたがって交叉し、あるいは交叉する傾向を示す。

驚くべきことにこれらの結果は、ACP医薬組成物を関節の連結部に注射した後に存在すると予想される濃度でACPを滑液に加えると、ACPの典型的レオロジーのプロファイルを変更することができることを示す。

実施例24：

ACPおよび実際に市販されている関節内注射による骨関節炎の処置用のHAに基づく製品の粘弾性の比較

現在市場にあり、関節内注射によって関節症の処置に用いられるHAに基づく製品には、以下のものが含まれる：

- ARTZ (Seikagaku, Japan)、分子量600,000および1,200,000 Da間のHAに基づく製剤；
- SYNVI SC (Biomatrix, U.S.A.)、2つの架橋されたHA誘導体、ヒラン (hylan) 液状物およびヒランゲルからなる2成分系 (US 4,713,448)；
- HYALGAN (Fidia)、分子量500,000および730,000間のHAに基づく製剤 (EP 0138572 B1)。

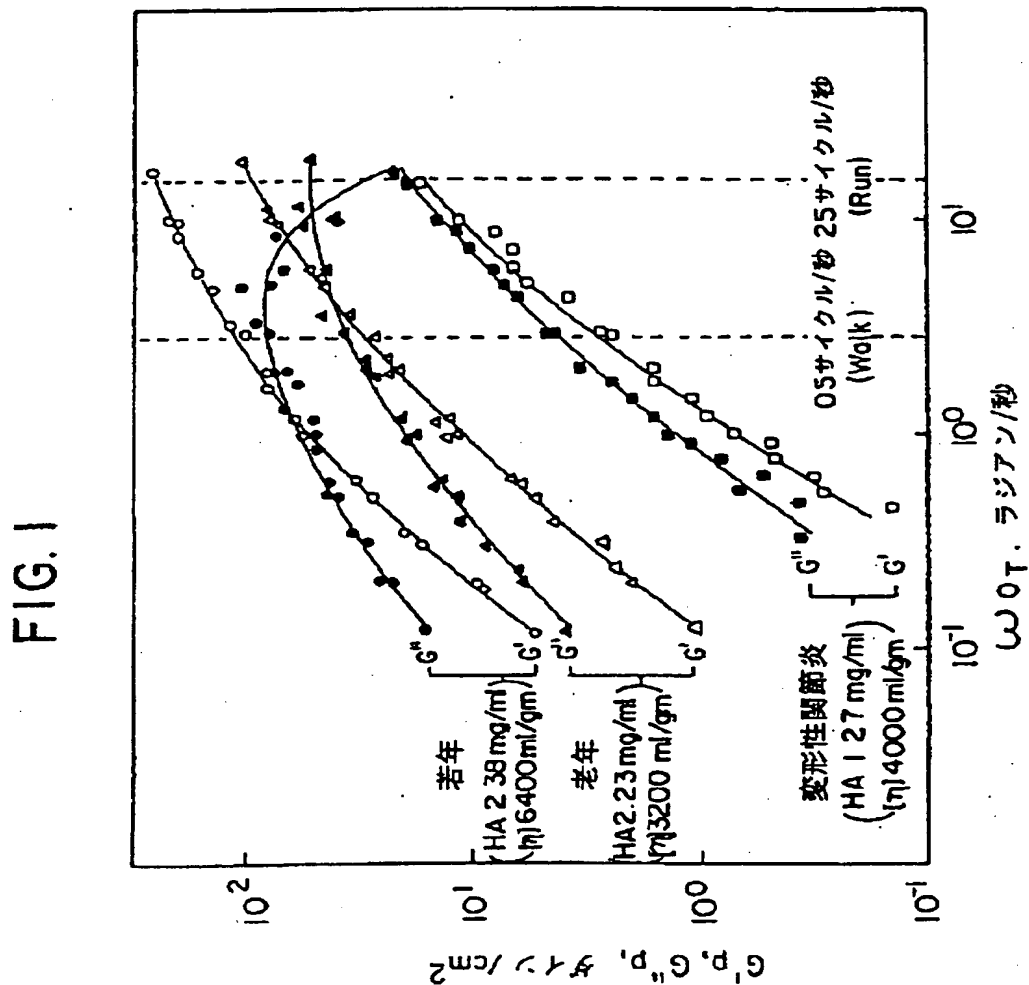
ACP 20%、0.5%水の動的粘度を上記医薬品の動的粘度と比較した。最終HA濃度および存在する医薬賦形剤に関して4つの製剤はすべて類似の特徴を有していた。この比較の結果を第16図に示し、ACP製剤が他の3つの市販製品と比べてより優れた動的粘度を有することを示す。

ACP/H A医薬組成物の開発は、現在入手可能な市販のHAに基づく関節症処置用製品と比べて、改良された粘弾性を有し、その結果、関節残留時間が増加した組成物を提供することを目的とする。また、これらの組成物中に含まれるACPおよびHAの比を変化させることによって、種々の起源の関節症の処置に最

適なレオロジー的性質を有する医薬組成物の製造が可能となる。

このように本発明を記載してきたが、同様のことをたくさんの態様で変化させることができることは明らかであろう。このような態様を本発明の意図および範囲から離れたものとみなすべきではなく、当業者にとって明らかであろうような修正のすべてが以下の請求の範囲に含まれることを意図するものである。

【図1】



【図2】

FIG. 2A

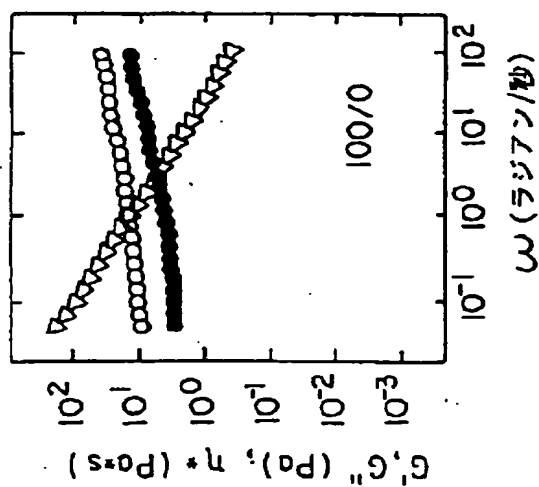
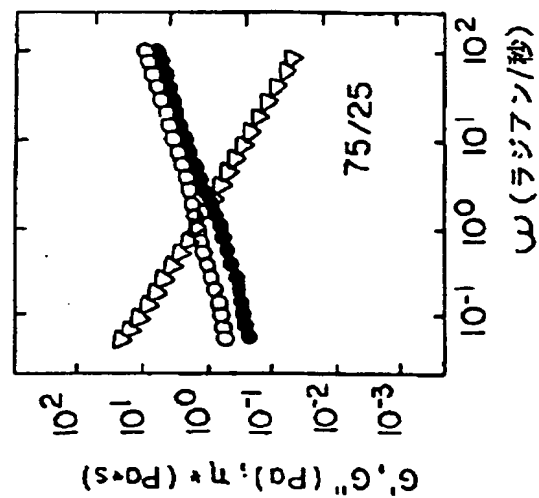


FIG. 2B



【図2】

FIG.2D

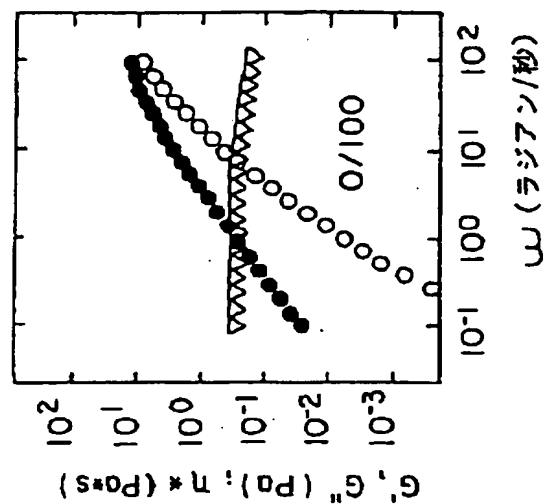
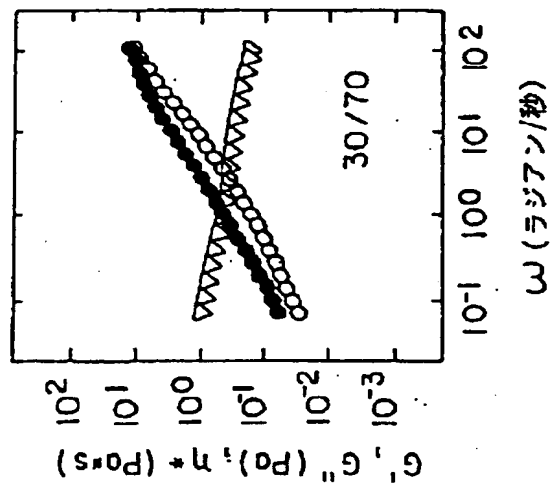
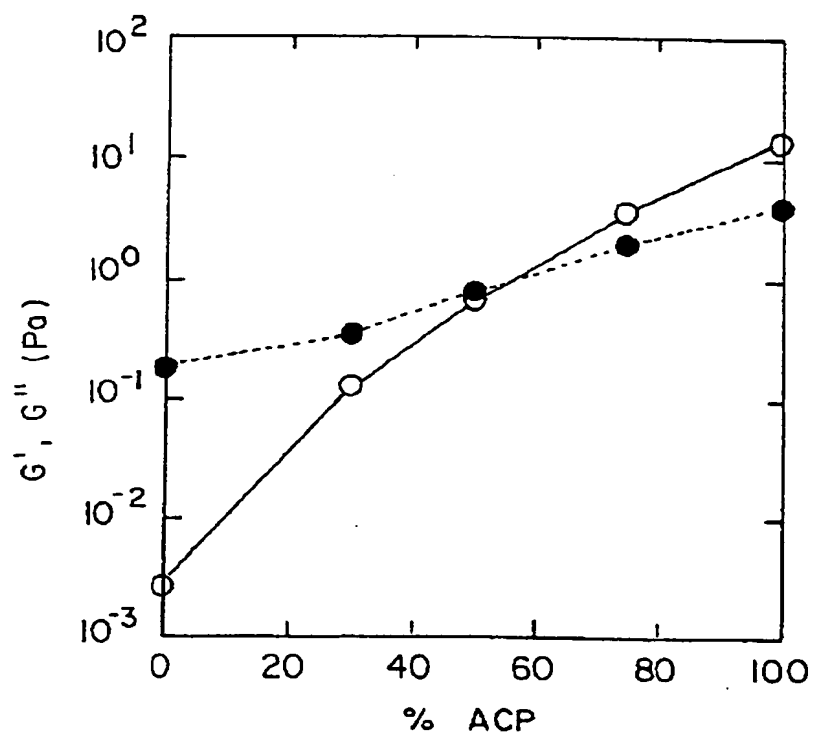


FIG.2C



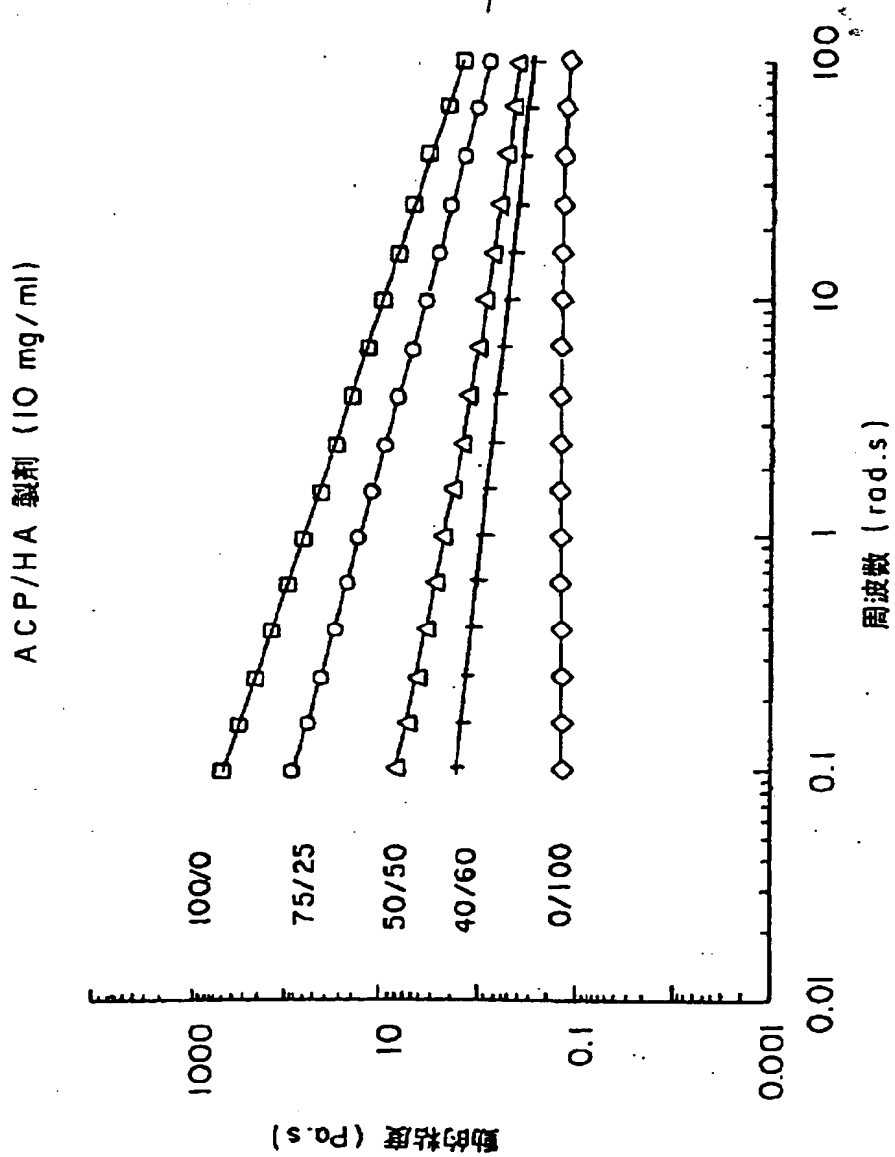
【図3】

FIG. 3



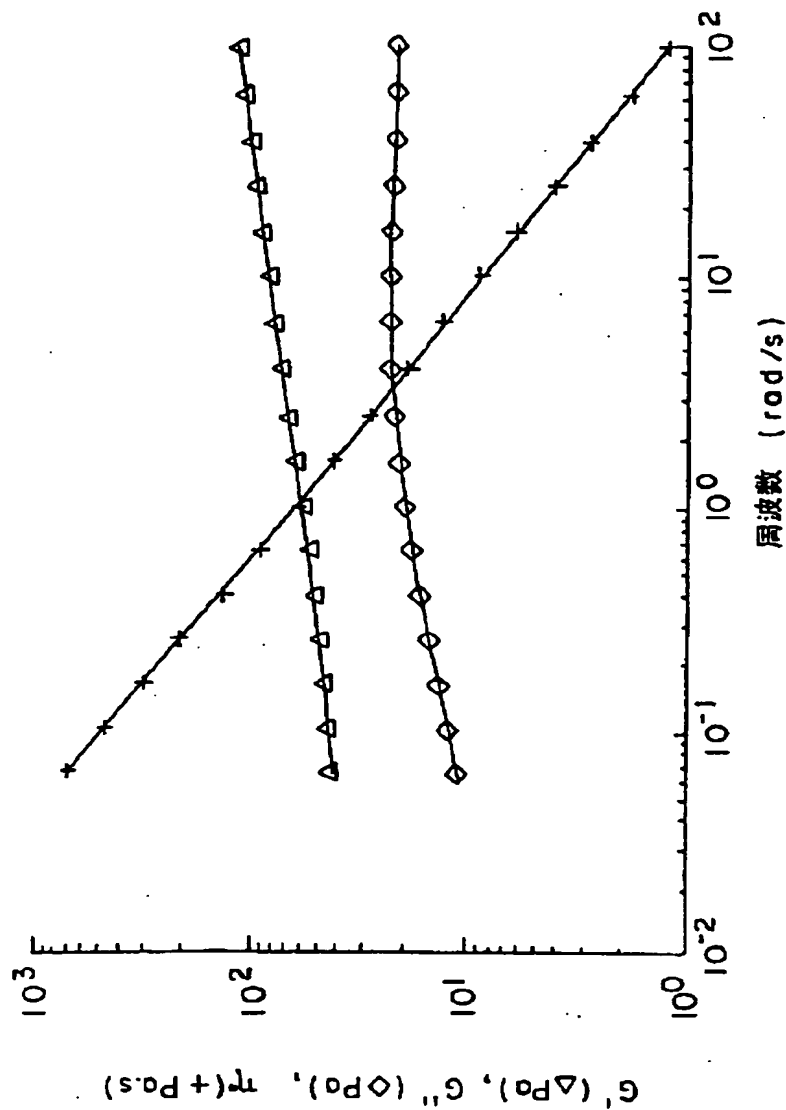
【図 4】

FIG. 4



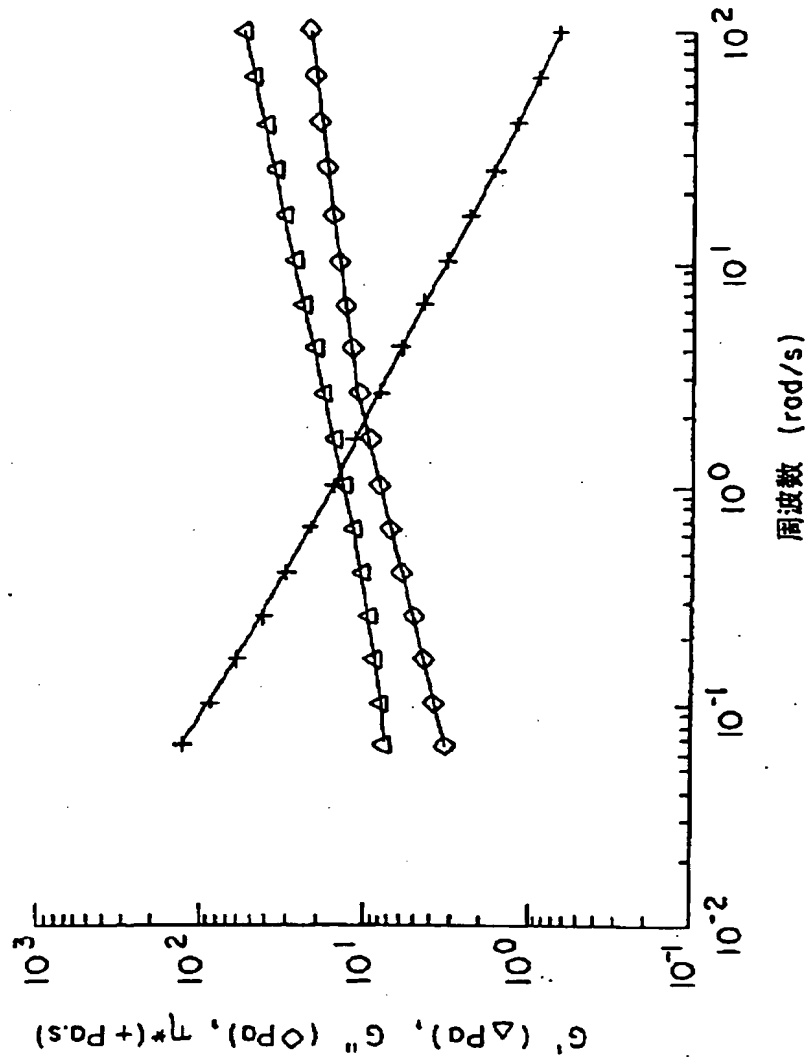
【図5】

FIG.5



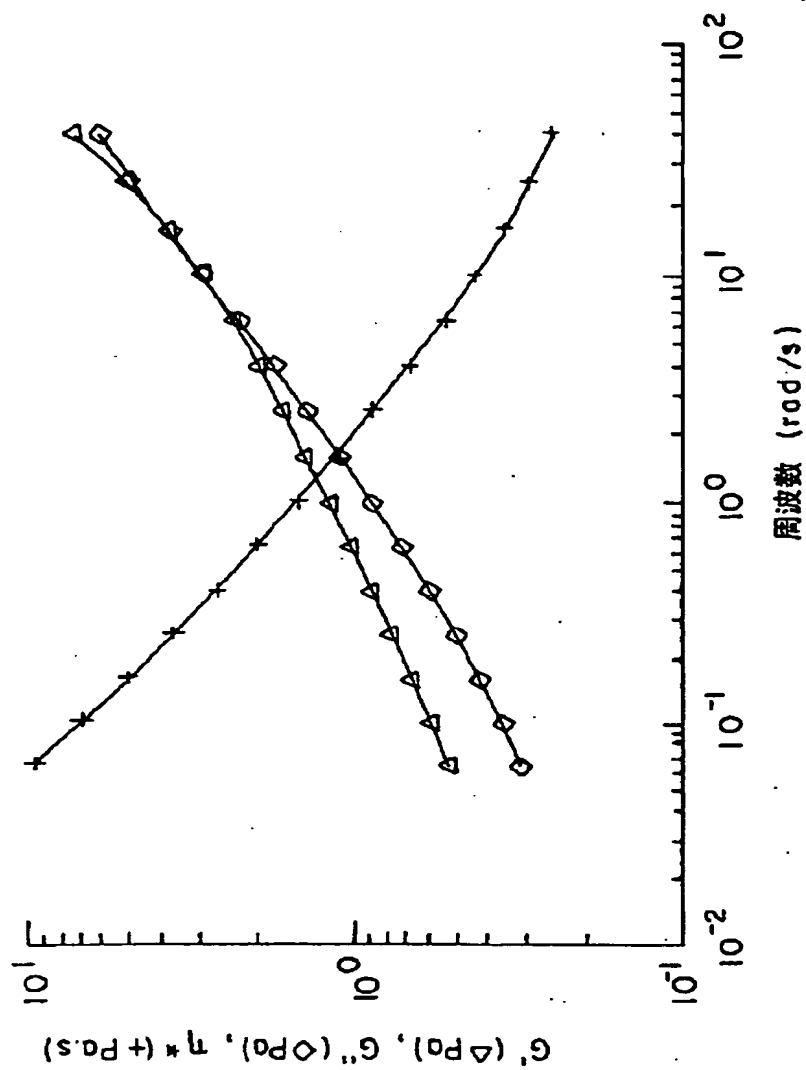
【図 6】

FIG. 6



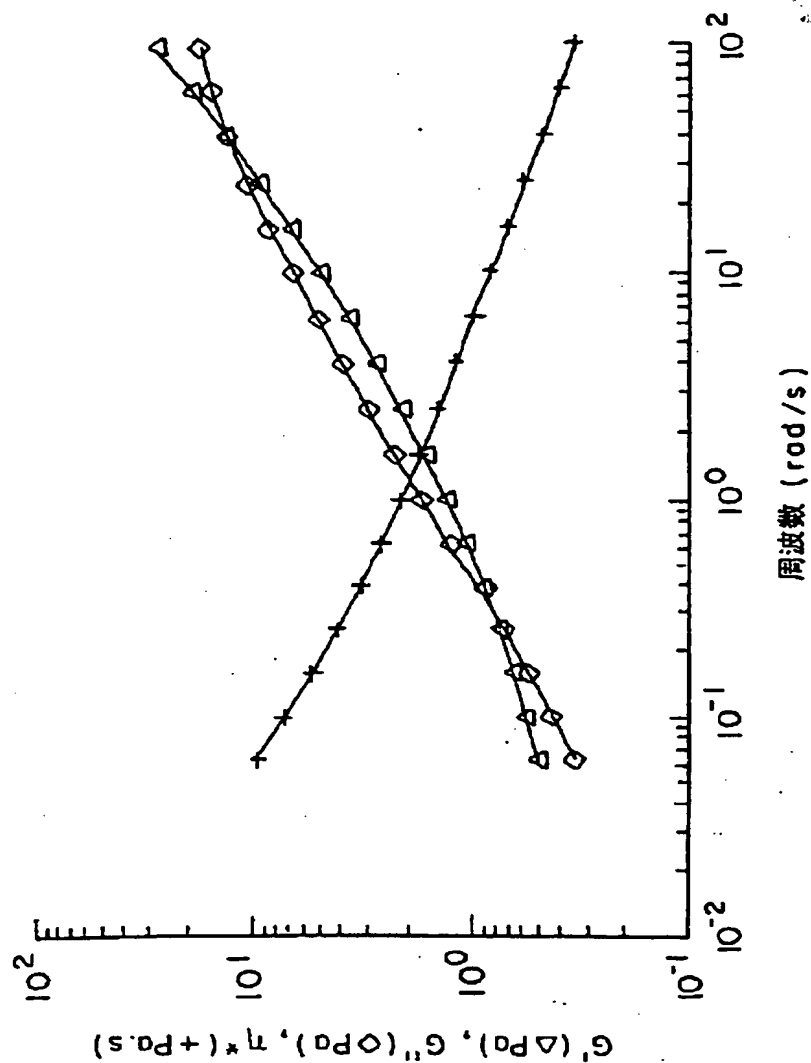
【図7】

FIG.7



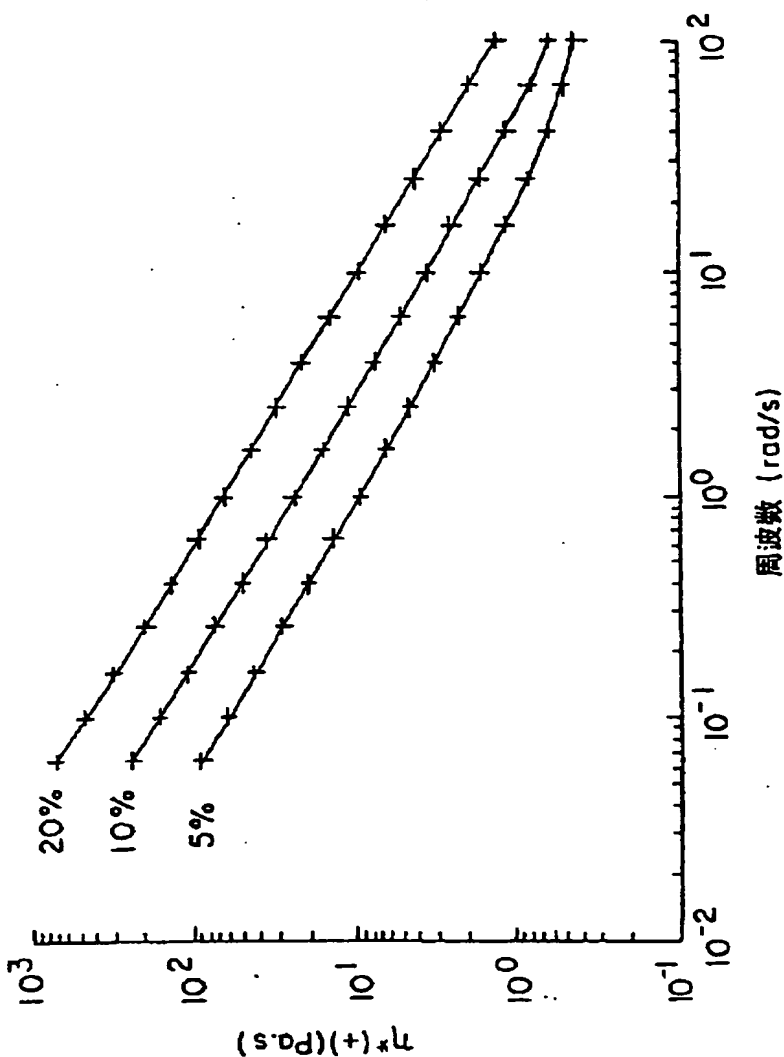
【図8】

FIG. 8



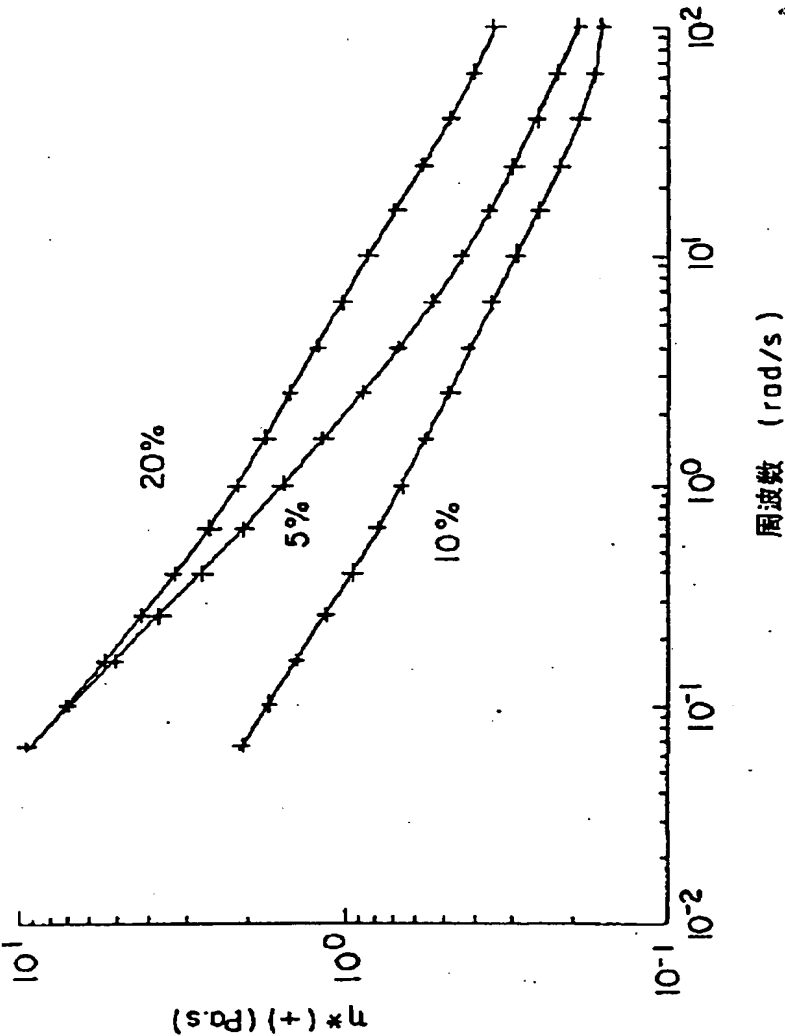
【図9】

FIG. 9



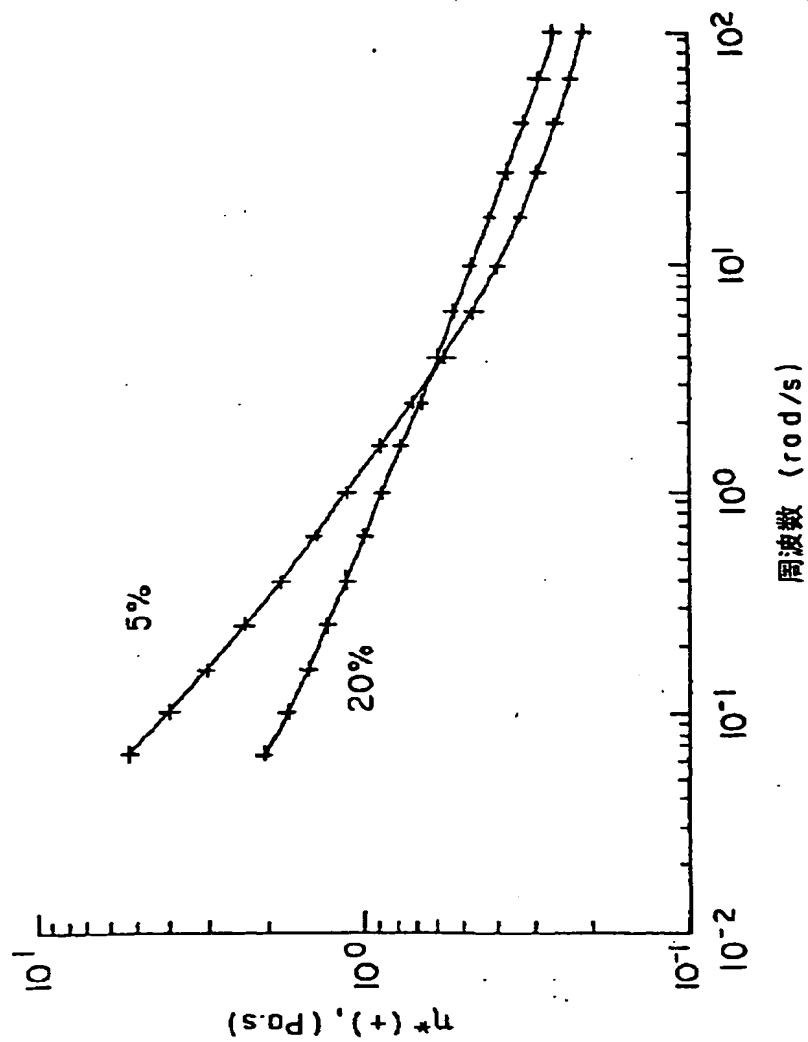
【図 10】

FIG.10



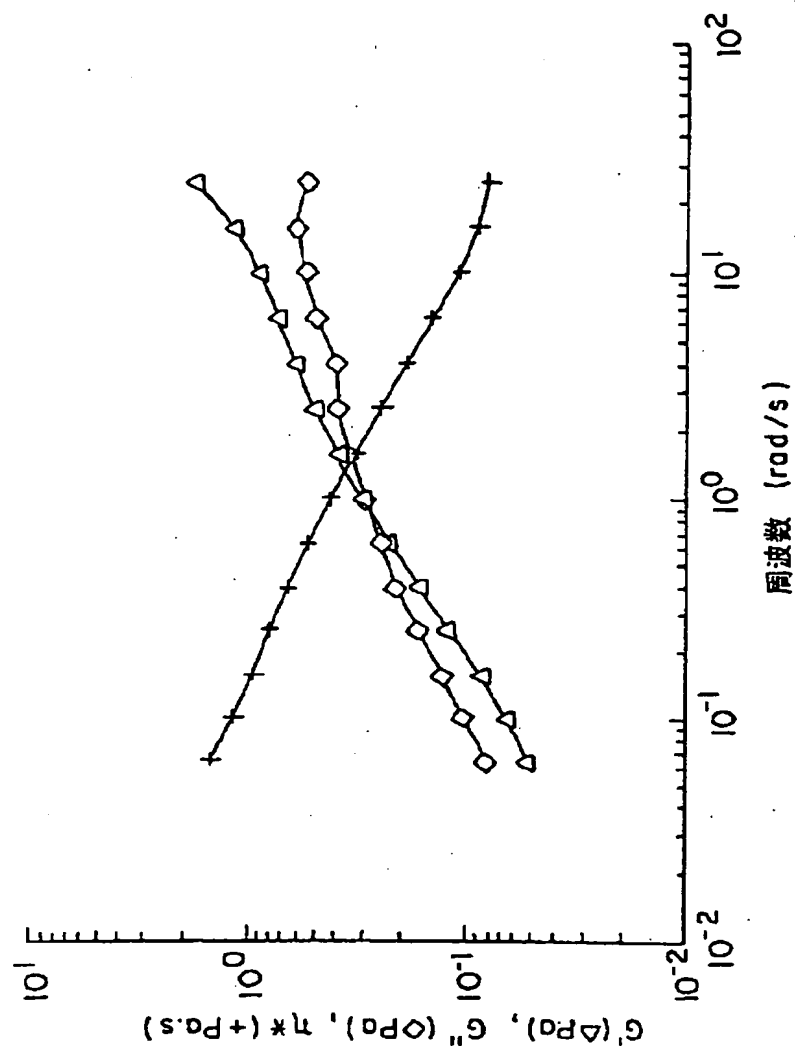
【図 1 1】

FIG. 11



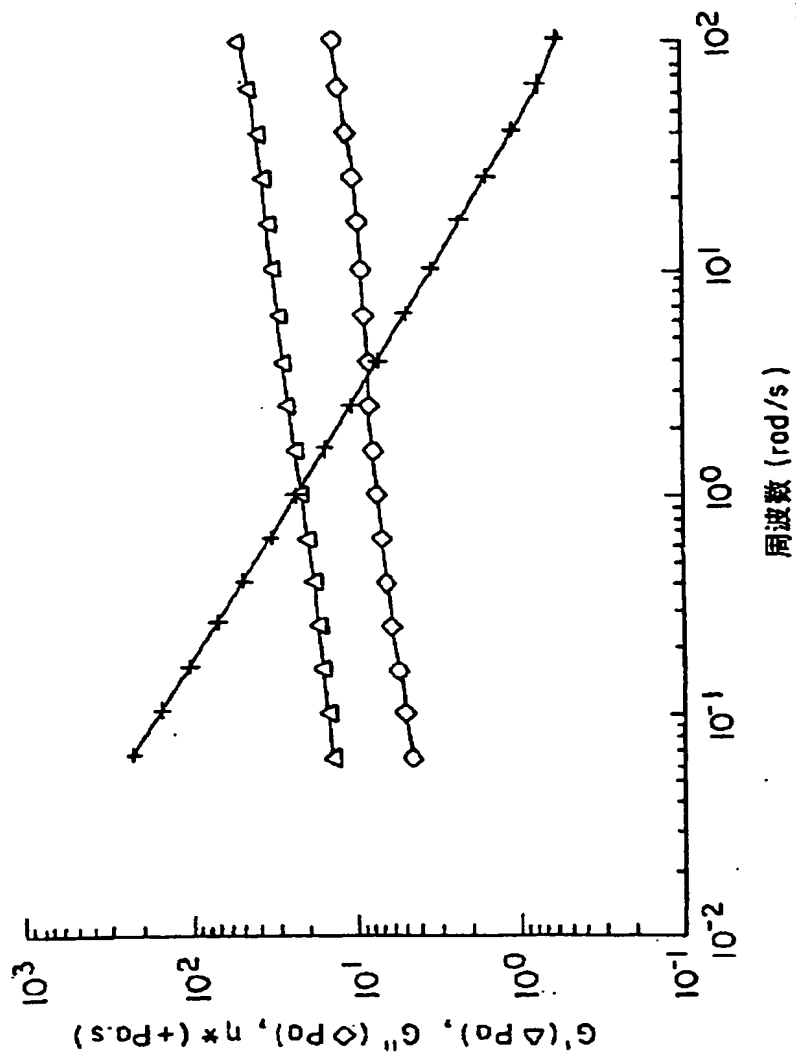
【図 1 2】

FIG.12



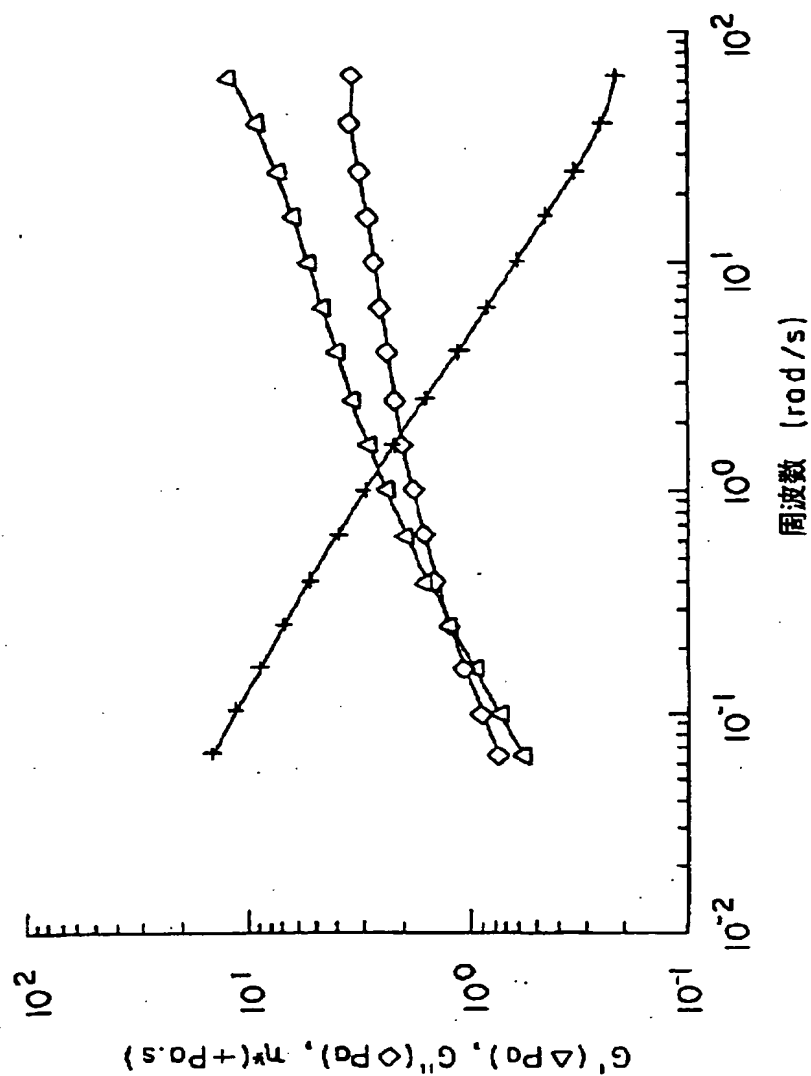
【図 13】

FIG.13



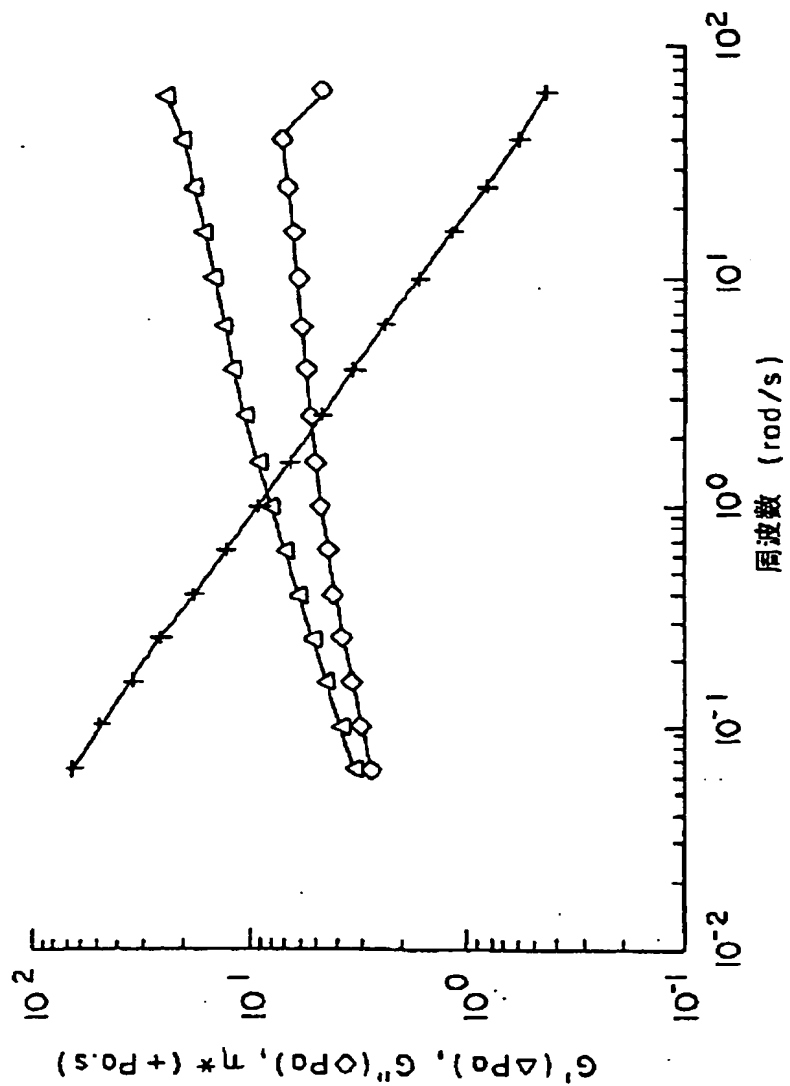
【図 1 4】

FIG. 14



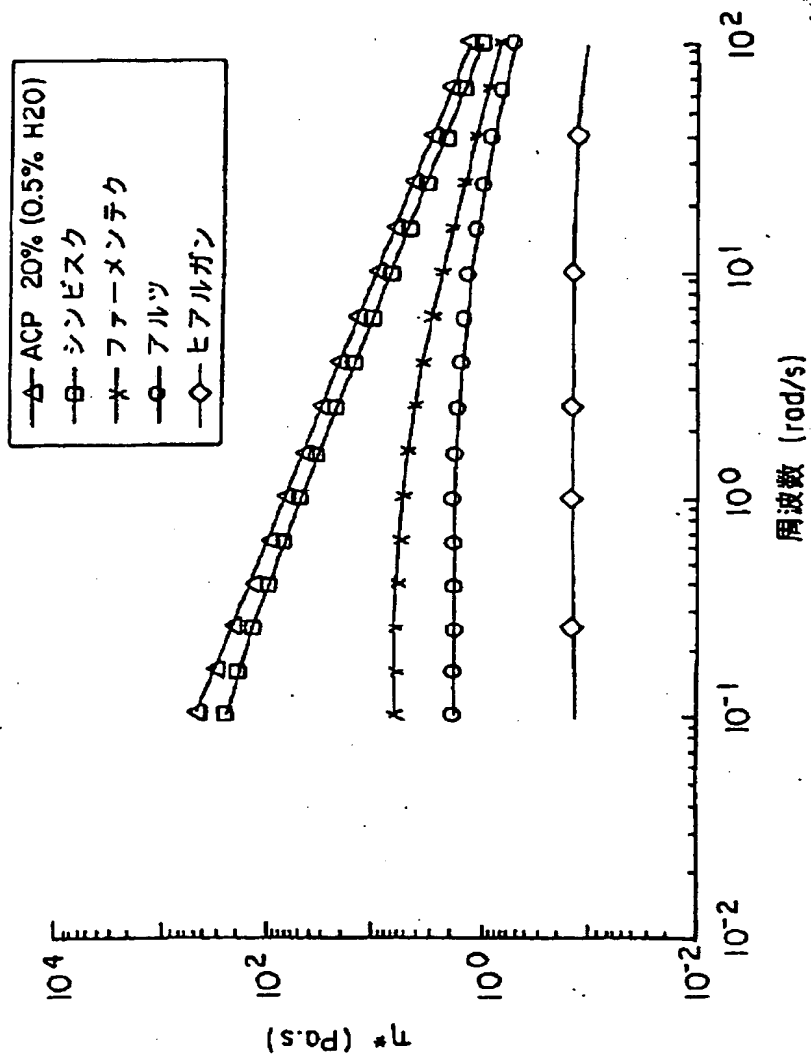
【図 15】

FIG.15



【図 16】

FIG.16



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/03238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89 10941 A (FIDIA SPA) 16 November 1989 cited in the application see page 38, line 10 - page 39, line 10 see page 56 - page 70 see examples 1-10 see page 102 - page 116 see examples 31-34, 36-39 ---	1-17
P.Y	EP 0 718 312 A (HERCULES INC) 26 June 1996 see page 8, line 20 - line 36 --- -/-	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 1997

Date of mailing of the international search report

19. 11. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2340, Telex 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seegert, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/03238

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	<p>ADAMS M.E. ET AL: "The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a Canadian multicenter trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone"</p> <p>OSTEOARTHRITIS CARTILAGE (ENGLAND), vol. 3, no. 4, 1995, pages 213-225, XP002045971 see abstract</p> <p>-----</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 97/03238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8910941 A	16-11-89	AT 115590 T	15-12-94
		AU 631125 B	19-11-92
		AU 3574789 A	29-11-89
		CA 1339122 A	29-07-97
		DE 68919900 D	26-01-95
		DE 68919900 T	11-05-95
		DK 10990 A	12-03-90
		EP 0341745 A	15-11-89
		EP 0614914 A	14-09-94
		ES 2064378 T	01-02-95
		HU 210926 B	28-09-95
		IL 90274 A	12-09-96
		JP 2504163 T	29-11-90
		NZ 229100 A	28-08-95
		US 5676964 A	14-10-97
EP 0718312 A	26-06-96	AU 4063495 A	27-06-96
		CA 2165890 A	23-06-96
		CN 1131675 A	25-09-96
		JP 8253504 A	01-10-96
		PL 312026 A	24-06-96

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, S D, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, F I, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, M X, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 オレガン, マイケル

イタリア、イー35037テオロ、ヴィア・サン・アントニオ5番

(72)発明者 カレガロ, ランフランコ

イタリア、イー36016ティエネ、ヴィア・モンテ・グラッパ6番

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)